Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit
EURATOM, München
(Leiter: Professor Dr. med. W. Stich)

DIE EINWIRKUNG VON PREDNISOLONACETAT AUF MENSCHLISCHES KNOCHENMARK IN VITRO (AUSGEWERTET IM GIEMSA-PRÄPARAT UND MIT ALKALISCHER LEUKOCYTENPHOSPHATASE)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich Christoph
Berlin

1972

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit
EURATOM, München
(Leiter: Professor Dr. med. W. Stich)

DIE EINWIRKUNG VON PREDNISOLONACETAT AUF MENSCHLISCHES KNOCHENMARK IN VITRO (AUSGEWERTET IM GIEMSA-PRÄPARAT UND MIT ALKALISCHER LEUKOCYTENPHOSPHATASE)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich Christoph
Berlin

Referent: Professor Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Professor Dr. med. Walther Pribilla

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 15. Dezember 1972

Inhaltsübersicht

	Seite
EINLEITUNG	2
FRAGESTELLUNG	7
METHODE	8
ARBEITSGANG	13
ERGEBNISSE	17
STATISTISCHE AUSWERTUNG	52
ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	62
DISKUSSION DER ERGEBNISSE	64
ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	68
LITERATUR	69

EINLEITUNG

Als ADDISON[1)] im Jahre 1855 ein durch Zerstörung der Nebennieren bedingtes Krankheitsbild beschrieb - man gab dieser Erkrankung später seinen Namen -, wußte man noch nichts von Hormonen. HYRTL beschrieb in seinem Anatomiebuch von 1873: "Die völlig unbekannte Funktion dieses Organs schützt es vor lästigen Nachfragen in der Medizin."

1900 entdeckte man das Nebennierenmarkhormon Adrenalin. Bis zum Jahre 1930 mußte man warten, ehe die ersten Extrakte aus der Nebennierenrinde hergestellt wurden. Es war aber noch nicht möglich, damit eine Therapie zu beginnen. 1936 erfolgte die Isolierung des Corticosterons als erstem Rindenhormon. Seit dieser Zeit wurden bis heute mehr als 40 verschiedene Hormone aus der Nebennierenrinde dargestellt. Als man im Jahre 1938 Desoxycorticosteron (Cortexon) synthetisch herstellte, konnte die Therapie beginnen. Erst später stellte sich heraus, daß Cortexon kein eigentliches Hormon sondern nur eine Vorstufe war. 1939 isolierte REICHSTEIN das Cortison, das HENCH[18)] 1948 in die Therapie einführte.

Obwohl Cortison heute keine große Bedeutung für die Therapie mehr hat, leitete es doch eine Ära ein, die sich revolutionierend auf die Behandlung der verschiedensten Krankheiten ausgewirkt hat.

Um die bei der Therapie mit Cortison auftretenden störenden Begleiterscheinungen - wie die Einwirkung auf den Mineralhaushalt - zu vermindern, versuchte man, das Cortisonmolekül so zu verändern, daß der therapeutische Wert erhalten blieb, die negativen Wirkungen aber schwächer wurden. So entwickelten amerikanische Forscher im Jahre

1955 durch mikrobielle Dehydrierung ein Präparat, das in therapeutischen Dosen vier- bis fünfmal stärker wirksam ist als das Cortison, den Wasser- und Mineralhaushalt jedoch kaum beeinflußt. Dieses Dehydrocortison nannte man Prednison. Durch Dehydrierung von Cortisol (= Hydrocortison), einem weiteren Hormon der Nebennierenrinde, erhielt man Prednisolon. Diese beiden Präparate haben sich im Laufe der Jahre hervorragend bewährt und werden noch heute als Standardpräparate für die Corticosteroidtherapie angesehen.

Eine entzündungshemmende Wirkung erkannte HENCH[18] im Jahre 1949 durch Gabe von Cortison. Seither wurde diese Wirkung in zahllosen Arbeiten auch an isolierten Zellen von Menschen und Tieren studiert. Man stellte dabei neben der entzündungshemmenden Eigenschaft auch eine Wachstumshemmung und ein immunsuppressives Verhalten fest.

Dieser wachstumshemmende Einfluß wurde von ROZEN[33], MACIEIRA[26], UNDRICOV[40] und RASCHE[31] bezweifelt. Sie bewiesen in ihren Untersuchungen, daß bei bestimmten niedrigen Konzentrationen von Corticosteroiden in den Versuchsansätzen eine Wachstumsförderung bzw. Überlebensverlängerung der Fibroblasten von Menschen, Ratten und Mäusen auftrat.

Eine Steigerung der Wachstumsaktivität sah auch QUITTNER[30] bei seinen Untersuchungen an Knochenmark- und Blutzellen von Mäusen. Er stellte aber fest, daß die Verstärkung des Wachstums nur bei massiven Cortisondosen in vitro sichtbar wurde.

Eine Steigerung der Proliferation von menschlichen Granuloblasten stellte BOLL[5] fest. Die Untersuchungsreihe ergab, daß nur bei einer relativ hohen Konzentration des zugesetzten Prednisolon-Natriumtetrahydrophthalat von 2,5 mg/ml eine Proliferationsförderung der weißen Reihe zu sehen war. Bei

den Kulturen mit niedrigeren Hormonkonzentrationen war keine eindeutige Aussage zu machen.

Ebenfalls eine deutlich gesteigerte Proliferation von menschlichen Fibroblasten und Knochenmarkzellen erzielten bei in vitro-Untersuchungen FARNES u. BARKER[12]. Die Kultivierung erfolgte unter Einfluß von 0,5 - 5,0 mg/ml Prednisolon während 2 - 5 Tagen.

Eine Proliferationshemmung dagegen fanden REISNER u. ODOM[32] bei einer ähnlichen Konzentration an Fibroblasten. Zum gleichen Ergebnis kam HEILMANN[17] mit fibroblastenähnlichen Zellen in vitro unter Einwirkung verschiedener Nebennierenrindenhormone.

In einer Versuchsreihe mit Kaninchen, die 3 Wochen lang täglich mit einer Prednisolondosis von 1,25 mg/kg Körpergewicht behandelt wurden, stellte FLEISCHER[13] fest, daß sich die Gesamtzellzahl des Knochenmarkes nach 2 Wochen Versuchsdauer um ca. 25 % verringert hatte, wobei besonders die gesamten Vorstufen der Erythropoese sowie die reifen Formen der Granulopoese zurückgegangen waren. Ebenso erkannte man eine Abnahme der Lymphocytenzahlen um etwa 5 % und einen deutlichen Rückgang der Retikulumzellen. Dieser Effekt trat aber erst nach 3 Wochen Behandlungsdauer auf.

Eine linear dosisabhängige Abnahme der Mitoserate menschlicher Granuloblasten erreichte NOWELL[29] bei steigender Zugabe von Prednisolon-21-phosphat in vitro. Den Knochenmarkkulturen waren verschieden hohe Prednisolondosen zwischen 2,0 µg/ml und 10,0 mg/ml zugesetzt worden. Die Mitoserate ging dabei schon bei der niedrigsten Konzentration auf etwa 25 % der Kontrollwerte zurück.

An Kulturen von Mäusefibroblasten sah TAIFOUR[37] unter Prednisoloneinfluß eine Verminderung der Mitoserate. Auch bei der niedrigsten Konzentration seiner Versuchsreihe zwi-

schen 0,1 µg/ml und 1.000 µg/ml war die Anzahl der Mitosen geringer als in den entsprechenden Kontrollen. Mit steigender Prednisolonkonzentration sank fast linear die Mitoserate.

Eine signifikante Proliferationshemmung bei Kultivierung von malignen Zellen aus soliden Tumoren erreichte HECKMANN[16] bei Versuchskonzentrationen von 25 µg/ml und von 250 µg/ml.

Bei Untersuchungen von lymphoiden Zellen, die aus lymphatischen Organen von solchen Patienten stammten, die vorher mit verschieden starken Prednisolondosen behandelt wurden, stellte MEISSNER[27] eine Hemmung der DNS-Synthese fest. Die Mitoserate nahm mit steigender Corticosteroidkonzentration ab. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch andere Forscher (GABOUREL u. ARONOW[14], GROSSER u. SWIM[15]). Unter ähnlichen Versuchsbedingungen sah auch JAFFE[20] eine Veringerung der Mitosehäufigkeit bei gleichzeitig steigender Prednisolondosis.

Eine Verminderung der RNS-Synthese bei menschlichen Lymphocyten, die mit Phytohaemagglutinin stimuliert waren, erbrachten Versuche von DARZYNKIEWICZ u. PIENKOWSKI[10]. In einer Verdünnungsreihe von 1,0 mg/ml - 10,0 mg/ml Prednisolon sahen sie mit steigender Dosis eine Verminderung der RNS-Synthese; daraus schlossen sie auf eine Abnahme der Mitoserate in den Lymphocyten.

Ebenfalls eine Einschränkung der RNS-Synthese bei lymphatischen Leukaemiezellen vom Rind und bei Ascites-Carcinom-Zellen von Mäusen sahen KUMMER u. OCHS[24] nach Gabe von Prednisolon. Die DNS-Synthese wurde ebenfalls vermindert, wobei der Effekt an den Leukaemiezellen noch stärker als an den Carcinomzellen sichtbar war.

Bei Gabe von H^3-Thymidin an Ratten kamen HUNSTEIN u. STREY[19] zu dem Ergebnis, daß durch Prednisolongabe die

Einbaurate von H^3-Thymidin in die Knochenmarkzellen gesenkt wurde.

Nach Gabe von Prednisolon sah STRAUSZ[35] eine Steigerung der Granulocytenzahlen im Blut von Menschen mit gleichzeitiger Steigerung der Aktivität der alkalischen Leukocyten-Phosphatase (ALP). Die Vermehrung der Granulocyten im Blut wurde auch von BISHOP[3] nach Injektion von 200 mg Cortisol beobachtet. Er begründete dieses Ansteigen durch eine verstärkte Ausschwemmung aus den Knochenmarkdepots. Zum gleichen Ergebnis kamen auch CREAM u. LABS[9] 5 Stunden nach oraler Gabe von 40 mg Prednisolon. Dieser Effekt war in den Untersuchungen bei jüngeren Menschen verstärkt.

Nach intravenöser Injektion von ACTH beobachtete SZATMAR[36] eine Steigerung der Aktivität der alkalischen Leukocyten-Phosphatase. Selbst Zellen, die vor der Hormonzufuhr keine Aktivität zeigten, waren nachher ALP-positiv.

Auch in vitro konnte man eine Steigerung der Aktivität der Phosphatase durch Gabe von Prednisolon erreichen. COX u. McLEOD[8] untersuchten Mamma-Zellen und sahen ebenfalls Zellen, die in den Kontrollen keine Fermentaktivität zeigten, nach Hormongabe aber ALP-positiv wurden. Auch bei HeLa-Zellen, denen im Kulturmedium 0,5 µg/ml Prednisolon zugesetzt war, war eine Steigerung der Phosphatase-Aktivität. Außerdem stellte man eine Verminderung der Proliferation um fast 40 % gegenüber Kontrollversuchen bei den HeLa-Zellen fest[7].

FRAGESTELLUNG

Bei den bisherigen Versuchen wurden fast immer unphysiologisch hohe Corticosteroiddosen verwendet. In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich die Proliferation der Knochenmarkzellen bei der Dosierung von 0,25 µg/ml Prednisolonacetat verhält und ob die ALP-Reaktion durch diese Hormonkonzentration verändert wird. Die Wirkung interessiert besonders im Hinblick auf die Therapie von Thrombo- und Leukopenien. Die Dosierung wurde gewählt, weil sie über der physiologischen Konzentration des Gesamt-Cortisols im Plasma (freies und an Protein gebundenes Cortisol) liegt (KRISCH[23]).

Zum anderen hatte TAIFOUR in seiner Arbeit mit Konzentrationen, die in Höhe der hier verwendeten lagen, gute Hemmung an Mäusefibroblasten in Kultur erzielt.

METHODE

Menschliches Knochenmark wurde nach der von BOLL[4]) modifizierten Carrel'schen Methode der Gewebezüchtung auf dem hängenden Koagulum kultiviert.

Dazu stellt man unter sterilen Bedingungen ein Koagulum her, das aus 50 % Eigenplasma, 30 % Eigenserum, 10 % Cornormon[R] und 10 % Prednisolonacetat-Lösung besteht. Die Hormonkonzentration beträgt 0,25 µg/ml Prednisolonacetat im Koagulum. Auf diese koagulierte Masse wird mit einem sterilen Metallhäkchen ein Bröckchen Knochenmark gesetzt, das mit einem winzigen Serumtröpfchen bedeckt wird. Dann befestigt man mit Vaseline einen Hohlschliffobjektträger über dem Koagulum und dreht die nun fertige Kultur um. Die Deckglasränder werden anschließend mit Hartparaffin luftdicht verschlossen. Danach folgt die Inkubation bei 37° C im Brutschrank.

Nach 24, 48 und 72 Stunden werden von der Kultur 2 Ausstriche angefertigt:

1. für die Pappenheim-Färbung
2. für die ALP-Färbemethode.

Parallel zu diesen Kulturen mit Prednisolonacetat-Zusatz liefen Versuche ohne jeglichen medikamentösen Zusatz. Auch hiervon wurden Präparate wie von den Prednisolonkulturen angefertigt.

Mit dem Originalpunktatausstrich ergaben sich also pro Versuch 7 Ausstriche für die Pappenheim-Färbung und 7 Präparate für die ALP-Spezialfärbung.

Die Differenzierung der einzelnen Zellen des menschlichen Knochenmarkes wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen:

A Erythropoese

1. Proerythroblast = Großer Zellkern umgeben von schmalem, stark basophilem Cytoplasmasaum mit kleinen Aussackungen.

2. basophiler Erythroblast = Zellkern kleiner als beim Proerythroblasten, Kernstruktur kompakter, Cytoplasmasaum stark basophil.

3. polychromatischer Erythroblast = Kernstruktur noch dichter, Kern kleiner; azidophiler Einschlag des an sich noch basophilen Cytoplasmas, bläulichrot.

4. oxyphiler Erythroblast = Cytoplasmafarbe wie beim Erythrocyten; kleiner, pyknotischer Kern, doch nicht ohne Struktur.

5. reifer Erythroblast = Cytoplasmafärbung polychromatisch oder wie beim Erythrocyten; schwarzer, pyknotischer Zellkern ohne jede Struktur.

B Granulocytopoese

1. Myeloblast = Schmaler, bläulicher Cytoplasmasaum, Kern-Plasma-Verhältnis 1:1,4; milchige Struktur des Kernes.

2. Promyelocyt = Größte Zelle der Granulocytopoese, Kern-Plasma-Verhältnis 1:3, Cytoplasma schwach blaurot mit starker azurophiler Granulation.

3. neutrophiler Myelocyt	= Zelle kleiner als Promyelocyt, ovaler bis bohnenförmiger Kern, Kern-Plasma-Verhältnis 1:3, keine azurophile Granulation; Kernstruktur dichter.
4. eosinophiler Myelocyt	= Zellform wie neutrophiler Myelocyt, aber mit dichter eosinophiler Granulation.
5. basophiler Myelocyt	= Wie vorige Zelle, doch mit blau-schwarzer Granulation.
6. Metamyelocyt	= Nierenförmiger Kern, sehr dichte Struktur, granuliertes Cytoplasma.
7. Stabkerniger	= Zellkern noch stärker eingebuchtet; Cytoplasma mit Granula.
8. neutrophiler Segmentkerniger	= Cytoplasma granuliert; Zellkern an zwei oder mehr Stellen stark eingeschnürt, so daß drei oder mehr Segmente entstehen.
9. eosinophiler Segmentkerniger	= Zellkern meist nur aus zwei Segmenten bestehend; Cytoplasma mit eosinophiler Granulation.
10. basophiler Segmentkerniger	= Zelle sieht dem neutrophilen Segmentkernigen ähnlich; Cytoplasma mit schwarz-blauen Granula.
C 1. Promonocyt	= Zellform ähnlich dem Myelocyten, doch Cytoplasmafarbe rauchgrau bis bläulich.
2. Monocyt	= Gelappter, eingebuchteter Kern; blaugraue Cytoplasmafärbung.

D Plasmazellen = Meist ovale Zellen mit exzentrisch gelagertem Kern; stark basophiles Cytoplasma mit perinukleärer Aufhellung; Kern hat oft sog. "Radspeichenstruktur", Kern-Plasma-Verhältnis 1:4,5.

E Retikulumzellen = Man unterscheidet große und kleine Retikulumzellen. Meist nur der Kern angefärbt. Runder bis ovaler großer Kern mit lockerer Struktur, rötlich; Cytoplasma selten sichtbar, wenn, dann mit langen, amöboiden Ausläufern.

phagocytierende Retikulumzellen = Form ähnlich den großen und kleinen Retikulumzellen, nur ist hier das Cytoplasma durch eingelagerte Stoffe besser abgrenzbar.

F Lymphocyten = Schmaler, schwach basophiler Cytoplasmasaum, bohnenförmiger Kern. Bei kleinen Lymphocyten oft nur ein Cytoplasmahäubchen auf dem Kern erkennbar.

G Lymphoblasten = Ähnelt dem Myeloblasten, Kernstruktur jedoch verwaschener, Cytoplasma hell- bis mittelblau.

H Megakaryocyten = Relativ selten vorkommende Riesenzelle mit gelapptem Cytoplasma, einkernig.

Von den 14 Präparaten, die nach 0, 24, 48 und 72 Stunden angefertigt wurden, haben wir jeweils 7 zur Beurteilung der Veränderung der alkalischen Leukocyten-Phosphatase nach der Azokupplungsreaktion (KAPLOW[22]), modifiziert von MERKER und HEILMEYER[28], wie bei DÜRING[11], gefärbt.

Zum Nachweis der ALP mit der Azokupplungsreaktion wird ein aromatischer Phosphorsäureester (Natrium-alpha-Naphthylphosphat) verwendet. Die ALP spaltet den Naphtholrest hydrolytisch ab, der sich dann mit dem zugegebenen stabilisierten Diazoniumsalz (Variaminblausalz B conc.) zu einem gefärbten Endprodukt, dem Azofarbstoff, verbindet.

ARBEITSGANG

1. Fixieren der trockenen Knochenmarkausstriche in 4-%iger Formollösung 15 Minuten bei Zimmertemperatur.
2. Gründliches Spülen unter fließendem Wasser (15 Minuten).
3. Inkubation im Kühlschrank bei plus 7° C 60 Minuten in Substratmischung aus 35 mg Natrium-alpha-Naphthylphosphat, 70 mg Variaminblausalz B conc. und 70 ml 0,1 n Veronal-HCl-Puffer (Herstellung nach SPANNHOFF[34]). pH-Wert (geprüft mit Universalindikatorpapier) liegt bei 9,2 - 9,6. Einstellen der Objektträger in die frisch zubereitete Mischung.
4. Gründliches Spülen unter fließendem Wasser (15 Minuten).
5. Gegenfärbung mit Haemalaunlösung 8 Minuten.
6. Abspülen mit Aqua dest., Lufttrocknung.
7. Um ein Herauslösen des Farbniederschlages unter der Betrachtung mit der Ölimmersion zu vermeiden, werden die Ausstriche mit Glyceringelatine und Deckgläschen eingebettet.

Durch das Abdecken lassen sich die Ausstriche auch noch nach einigen Tagen auswerten. Ohne Glyceringelatine kommt es zu Rissen und Verfärbungen in der aufgetragenen Schicht. Es war bei unseren Versuchen kein Farbintensitätsunterschied zwischen sofort nach dem Ausstreichen gefärbten Präparaten und denen, die einige Tage im Gefrierfach gelegen hatten, zu erkennen.

Die Klassifizierung der Phosphatase-aktiven Knochenmarkzellen erfolgte nach dem Bewertungsverfahren von KAPLOW, modifiziert von MERKER und HEILMEYER[28]:

0 = keine Reaktion.
I = Deutlich erkennbare Farbstoffniederschläge im Zellzentrum diffus oder granulär, eben beginnend.
II = Inhomogene braune Niederschläge zur Zellperipherie fortschreitend.
III = Homogen verteilte Farbstoffniederschläge in der ganzen Zelle meist granulär, Cytoplasma noch erkennbar.
IV = Fleckenweise Zunahme der Farbstoffpräzipitate, braunschwarz. Die Zelltransparenz in diesen Bereichen schwindet, Kern noch gut abgrenzbar.
V = Homogene Ausfüllung der ganzen Zelle mit braun-schwarzen Farbstoffniederschlägen ohne jede Transparenz. Zellkern teils überlagert, teils noch erkennbar.

Die Differenzierung der einzelnen Zellen der Granulocytopoese ist bei der Spezialfärbung nicht ganz so einfach wie bei der Giemsa-Färbung, denn Basophilie des Cytoplasmas und die Granulierung als wichtige Unterscheidungsmerkmale fehlen hier völlig. Es muß daher nach anderen Kriterien vorgegangen werden:

1. Zellgröße
2. Kernstruktur
3. Kernform
4. Kern-Plasma-Verhältnis.

I Myeloblast = Zellkern ist nur von einem schmalen Cytoplasmasaum umgeben, Kern wirkt durch seine Chromatinstruktur verwaschen und milchig, Nucleoli oft deutlich erkennbar. Kern-Plasma-Verhältnis 1:1,4.

II Promyelocyt = Größte Zelle der Granulocytopoese, breiterer Cytoplasmasaum als beim Myeloblasten, ovaler oder leicht eingebuchteter Kern. Kern-Plasma-Verhältnis 1:3.

III Myelocyt	= Zelle etwas kleiner als der Promyelocyt, Kern oft nierenförmig, dichtere Chromatinstruktur als beim Promyelocyten, Kern-Plasma-Verhältnis 1:3.
IV Metamyelocyt	= Kern noch stärker eingebuchtet als beim Myelocyten, Struktur noch dichter.
V Stabkerniger	= Der Kern hat meist Hufeisenform, dichter strukturiert.
VI Segmentkerniger	= Fadenförmige Einschnürungen oder Verdünnungen bis auf 1/3 sind beim Kern sichtbar.
VII Retikulumzellen große und kleine	= Zellkern rund bis oval, lockere Struktur; Cytoplasma nicht angefärbt.
phagocytierende Retikulumzellen	= Ähnlich den großen und kleinen Retikulumzellen; Cytoplasma durch phagocytierte Stoffe abgrenzbar.

Um zu vergleichbaren Ergebnissen zu kommen, findet der von DÜRING[11)] erstmals für die gesamte Granulocytopoese aufgestellte ALP-Index hier Anwendung:

Die Anzahl der in den einzelnen Reaktionsstufen (0 - V) ermittelten Zellen einer Reifestufe der Granulocytopoese wird mit ihrer Reaktionsstufe multipliziert. Die 6 Produkte, die sich aus den einzelnen Reaktionsstufen ergeben, werden addiert, diese Summe dann mit 100 multipliziert und durch die Gesamtzahl der für diese Reifestufe ausgezählten Zellen dividiert. Das Ergebnis wird ALP-Index genannt.

Die Errechnung des ALP-Gesamtindex geschieht ähnlich, nur werden hier alle ausgezählten granulocytopoetischen Zellen eines Ausstriches ohne Unterscheidung in Reifestufen herangezogen. Man geht folgendermaßen vor:

Der ALP-Index einer Reifestufe wird mit der dieser Stufe zugehörigen Zellzahl multipliziert; danach werden die so entstandenen 6 Produkte addiert und diese Summe durch die Gesamtzahl der granulocytopoetischen Zellen dieses Ausstriches dividiert. Damit erhält man den ALP-Gesamtindex für die Granulocytopoese.

Da sich bei Versuchen von DÜRING ergeben hat, daß auch die retikulären Zellen ALP-Aktivität zeigen und weil Prednisolon besonders auf das Retikulum wirken soll, wurde diese Zellart ebenfalls ausgewertet und auch hierfür ALP-Indices errechnet. Die Indices für große, kleine und phagocytierende Retikulumzellen werden sinngemäß nach dem für die Granulocytopoese oben angegebenen Schema berechnet. Ebenso wird auch hier ein ALP-Gesamtindex ermittelt, nur daß als Divisionsfaktor die Gesamtzahl der retikulären Zellen dient.

ERGEBNISSE

Es wurden Knochenmarkproben von 5 Patienten untersucht, davon wurden die Proben von 4 Patienten auf die Auswirkungen des Prednisolons auf die Proliferation hin ausgewertet. Keiner dieser Patienten stand während oder kurz vor der Sternalpunktion unter einer Corticosteroid-Therapie. Bei 4 der 5 Knochenmarkproben wurden zusätzlich Untersuchungen über das Verhalten der Aktivität der alkalischen Leukocytenphosphatase vorgenommen.

Als Maß für die Auswirkungen des Prednisolons auf die Proliferation dienten Reifungskurven, Mitoseindices, G/E-Indices und karyologische Kurven.

Ausgewertet wurden 84.000 Zellen des menschlichen Knochenmarkes, davon 56.000 Zellen im Giemsa-Präparat und 28.000 Zellen in der ALP-Spezialfärbung.

Erläuterungen zu den Abbildungen 1 - 4:

Aufgetragen wurden auf der linken Seite auf der Abszisse die Zellen der Erythropoese. Es bedeuten:

O - PE = Proerythroblasten in %
PE-bE = basophile Erythroblasten in %
bE-pE = polychromatische Erythroblasten in %
pE-oE = oxyphile Erythroblasten in %
oE-rE = reife Erythroblasten in %.

Aufgetragen wurden auf der rechten Seite auf der Abszisse die Zellen der Granulocytopoese. Es bedeuten:

O - Mb = Myeloblasten in %
Mb-Pmy = Promyelocyten in %
Pmy-My = neutrophile Myelocyten in %
My-eM = eosinophile Myelocyten in %
eM-bM = basophile Myelocyten in %
bM-PM = Promonocyten in %
PM-MM = Metamyelocyten in %
MM-St = Stabkernige in %
St-Sg = neutrophile Segmentkernige in %
Sg-eSg = eosinophile Segmentkernige in %
eSg-bSg = basophile Segmentkernige in %
bSg-Mon = Monocyten in %
——— = Kontrollkulturen
----- = Prednisolonacetat-Kulturen.

Auf den Ordinaten wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden Kultivierungszeit aufgetragen.

Fall I: R. K., 59 Jahre

Klinische Diagnose: Infektanaemie (Zustand nach grippalem Infekt)

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion: 2 x 0,25 mg Lanicor^{R} pro die

Blutbild am Tage der Sternalpunktion: Hb = 12,6 g%, Erythrocyten = 3,79 Mill./cmm, Hb_E = 33,1 pg, Retikulocyten = 15 ‰, Thrombocyten = 192.000/cmm, Fe im Serum = 138 gamma-%, Leukocyten = 3.800/cmm.

BSG: 21/45 mm n.W.

Sternalpunktion: Vermehrte linksverschobene Erythropoese wie z.B. nach Aufhebung der Eisenblockade im RES nach abgeklungenem Infekt.

Wie aus der Reifungskurve für die Erythropoese ersichtlich ist, findet man unter Zusatz von Prednisolonacetat nach

Abb. 1

Fall I: R. K.

24 Stunden Kultivierungszeit eine geringere Zahl reifer Zellen als in der Kontrollkultur. Auch nach 48 Stunden überwiegt in der Zusatzkultur die Zahl der reiferen Zellen. Nach 72 Stunden liegen die Werte von Kontroll- und Prednisolon-Kultur etwa auf gleicher Höhe (Abbildung 1).

Man kann von einer signifikanten Ausreifungshemmung der roten Reihe für diesen Fall durch Prednisolonacetat sprechen (Tabelle 15).

Für die Granulocytopoese findet man nur nach 24 Stunden mehr Myelocyten in der Zusatzkultur. Nach 48 Stunden überwiegen in der Prednisolon-Kultur die reifen Zellen etwas. Dagegen sieht man im 72-Stunden-Ausstrich, daß die Kontroll-Kultur mehr reife Zellen enthält.

Insgesamt ist zwischen Kontroll- und Prednisolon-Kultur kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abbildung 1).

Die G/E-Indices liegen in den Zusatzkulturen niedriger als in den Kontrollausstrichen. Das spricht für eine Reifungshemmung der Erythropoese (Tabelle 5).

Der Mitoseindex der roten Reihe sinkt unter Prednisolon-Einwirkung ab; nach 48 Stunden sind keine Mitosen in der roten Reihe zu sehen. Erst nach 72 Stunden findet man wieder ein Ansteigen des Index'. Die Regeneration ist also geringer geworden (Tabelle 6).

Der granulocytopoetische Mitoseindex liegt in den Zusatzpräparaten ebenfalls niedriger. Auch hier ist nach 48 Stunden keine Zellteilung zu erkennen. Wie in der roten Reihe steigt die Mitoseaktivität wieder nach 72 Stunden. Auch hier ist die Regeneration vermindert (Tabelle 7).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Proliferation der roten Reihe stark, die der weißen Reihe unter Prednisolon-Einfluß etwas vermindert ist.

Tabelle 1: ALP-Indices/zugehörige Zellzahl

ALP-Indices bei den Kontrollen

	0 h	24 h	48 h	72 h
gr. Retikulumzellen	0/208	114/ 28	184/ 57	3/128
kl. Retikulumzellen	2/292	47/243	128/170	12/418
phag. Retikulumzellen	200/ 6	0/ 3	210/ 90	20/ 34
Gesamtindex	3/586	5/274	161/137	11/580
Myeloblasten	0/ 4	0/ 3	0/ 7	0/ 3
Promyelocyten	0/ 37	12/ 25	11/ 70	0/ 14
Myelocyten	0/104	19/270	73/131	32/ 82
Metamyelocyten	3/156	82/167	110/125	40/127
Stabkernige	6/ 95	137/ 71	196/120	107/ 68
Segmentkernige	48/113	104/214	195/281	156/ 94
Gesamtindex	13/429	38/750	140/734	77/388

ALP-Indices bei Prednisolonacetat-Zusatz

	24 h	48 h	72 h
gr. Retikulumzellen	21/107	140/219	153/160
kl. Retikulumzellen	46/176	33/370	25/432
phag. Retikulumzellen	139/ 44	91/ 86	177/ 44
Gesamtindex	50/327	75/675	68/636
Myeloblasten	0/ 6	0/ 20	0/ 9
Promyelocyten	0/132	58/116	73/ 33
Myelocyten	10/104	169/123	110/ 78
Metamyelocyten	47/127	279/118	168/ 85
Stabkernige	77/149	278/ 41	260/ 28
Segmentkernige	75/137	252/141	256/ 68
Gesamtindex	44/655	203/559	166/301

Im Sofortausstrich zeigen bei den retikulären Zellen nur die kleinen und die phagocytierenden Retikulumzellen ALP-Aktivität. Sowohl in den Kontrollen als auch in den Ausstrichen mit Prednisolonacetat-Zusatz erkennt man eine Zunahme der ALP-Aktivität im Laufe der 72 Stunden bei allen Retikulumzellen. Demzufolge steigt auch der ALP-Gesamtindex bis zum 48-Stunden-Ausstrich kontinuierlich an. Nach 72 Stunden ist ein Absinken der ALP-Aktivität zu verzeichnen; jedoch liegt dieser Wert nicht unter dem ALP-Index des Sofortausstriches.

In der Granulocytopoese findet man im Originalausstrich nur bei den Metamyelocyten, den Stabkernigen und den Segmentkernigen ALP-Aktivität. Im Laufe von 48 Stunden zeigen hier alle Zellarten bis auf die Myeloblasten eine Steigerung ihrer Fermentaktivität. Nach 72 Stunden sieht man einen Aktivitätsrückgang, der aber nicht unter dem 24-Stunden-Wert liegt.

Das Ansteigen der ALP-Aktivität bis zum 48-Stunden-Ausstrich ist auch in den Präparaten mit Prednisolon-Zusatz zu erkennen. Danach läßt sich ein Absinken der Aktivität feststellen. Die ALP-Indices liegen im Vergleich zu den Kontrollen hier insgesamt höher (Tabelle 1).

Fall II: R. B., 59 Jahre

Klinische Diagnose: Hypochrome Anaemie bei blutenden Haemorrhoidalknoten, BSG-Beschleunigung unklarer Ätiologie.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion: Keine Medikation.

Blutbild am Tage der Sternalpunktion: Hb = 10,6 g%, Erythrocyten = 3,67 Mill./cmm, Hb_E = 29,0 pg, Thrombocyten = 211.000/cmm, Fe im Serum = 37 gamma-%,

Abb. 2

Fall II: R.B.

Leukocyten = 5.600/cmm, Basophile = 1 %, Eosinophile = 3 %, Stabkernige = 1 %, Segmentkernige = 77 %, Lymphocyten = 17 %, Monocyten = 1 %.

BSG: 36/70 mm n.W.

Sternalpunktion: Gesteigerte, linksverschobene Erythropoese entsprechend einer Eisenmangelanaemie bei chronischer Blutung. Retikulum- und Plasmazellvermehrung wie sie bei Hepatopathie vorkommt.

Bei Betrachtung der Reifungskurven für die Erythropoese fällt eine geringere Zahl reifer Zellen in den Hormonzusatzkulturen gegenüber den Kontrollen auf. Beim 24-Stunden-Ausstrich beginnt der Unterschied sichtbar zu werden, tritt nach 48 Stunden stärker hervor und geht nach 72 Stunden wieder etwas zurück (Abbildung 2).

Insgesamt gesehen kann man hier von einer signifikanten Ausreifungshemmung durch Prednisolonacetat sprechen (Tabelle 15). In der weißen Reihe findet man beim Vergleich der Reifungskurven nach 24 Stunden eine geringere Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten in den Prednisolon-Kulturen. Nach 48 Stunden findet man unter Hormoneinfluß noch mehr unreife Zellen. Nach 72 Stunden decken sich die Werte von Kontroll- und Zusatzpräparat fast (Abbildung 2).

Das Prednisolonacetat hat in der Granulocytopoese eine Verzögerung der Zellreifung bewirkt, die statistisch signifikant ist (Tabelle 15).

Die G/E-Indices liegen in den Kontrollen und in den Prednisolon-Ansätzen nahezu auf gleicher Höhe (Tabelle 5).

Der Mitoseindex der roten Reihe liegt in den Zusatzkulturen nach 24 und 48 Stunden unter dem der Kontrollen. Es

läßt sich daher auf eine Verminderung der Regeneration der roten Reihe schließen (Tabelle 6).

In der Granulocytopoese ist der Mitoseindex besonders nach 24 Stunden in der Prednisolon-Kultur niedriger. Daher findet man in der Reifungskurve auch eine geringere Anzahl Granuloblasten zu diesem Zeitpunkt. Nach 48 Stunden ist der Unterschied der Mitosehäufigkeit nicht sehr groß. In den 72-Stunden-Kulturen liegt der Index in der Zusatzkultur niedriger. Auch in der weißen Reihe hat Prednisolon die Regeneration verringert - besonders nach 24 Stunden (Tabelle 7).

In diesem Fall wurde die Zellproliferation unter Einwirkung von Prednisolonacetat in der Erythropoese und in der Granulocytopoese vermindert.

Tabelle 2: ALP-Indices/zugehörige Zellzahl

ALP-Indices bei den Kontrollen

	0 h	24 h	48 h	72 h
gr. Retikulumzellen	25/ 64	75/231	52/112	258/221
kl. Retikulumzellen	0/156	6/162	23/286	92/257
phag. Retikulumzellen	50/ 8	68/ 40	42/ 38	129/ 73
Gesamtindex	9/228	13/433	20/436	167/551
Myeloblasten	75/ 8	0/ 6	0/ 4	143/ 14
Promyelocyten	6/ 85	0/ 41	49/ 86	191/ 32
Myelocyten	10/242	92/134	146/259	219/163
Metamyelocyten	3/194	78/105	156/162	220/124
Stabkernige	16/188	91/128	190/ 58	280/ 88
Segmentkernige	45/167	168/157	154/ 69	303/ 84
Gesamtindex	17/884	101/571	134/638	240/505

ALP-Indices bei Prednisolonacetat-Zusatz

	24 h	48 h	72 h
gr. Retikulumzellen	37/104	81/175	50/ 4
kl. Retikulumzellen	10/100	61/167	2/ 92
phag. Retikulumzellen	80/ 20	159/ 29	0/ 0
Gesamtindex	29/224	81/371	4/ 96
Myeloblasten	0/ 4	0/ 0	25/ 8
Promyelocyten	6/ 68	0/ 17	124/ 21
Myelocyten	57/216	127/244	115/258
Metamyelocyten	145/142	156/111	97/138
Stabkernige	168/106	196/105	115/195
Segmentkernige	125/260	198/142	114/286
Gesamtindex	108/796	155/619	111/906

Bei Betrachtung der ALP-Indices fallen die relativ hohen Werte der retikulären Zellen im Sofortausstrich auf. Der Gesamtindex steigt kontinuierlich bis zum 48-Stunden-Ausstrich an und macht erst nach 72 Stunden einen gewaltigen Sprung nach oben.

Bei den Prednisolonacetat-Kulturen fehlt dieser Anstieg. Der Gipfel liegt bereits im 48-Stunden-Ausstrich. Die Indices vom 24- Stunden- und 48-Stunden-Präparat liegen höher als die vergleichbaren Kontrollwerte. Nach 72 Stunden findet man einen Abfall der ALP-Aktivität.

Ähnliche Tendenz zeigen die Indices für die Zellen der Granulocytopoese. In den Leerversuchen steigt der Gesamtindex von 0 Stunden über 24 und 48 Stunden weiter bis zum 72-Stunden-Ausstrich.

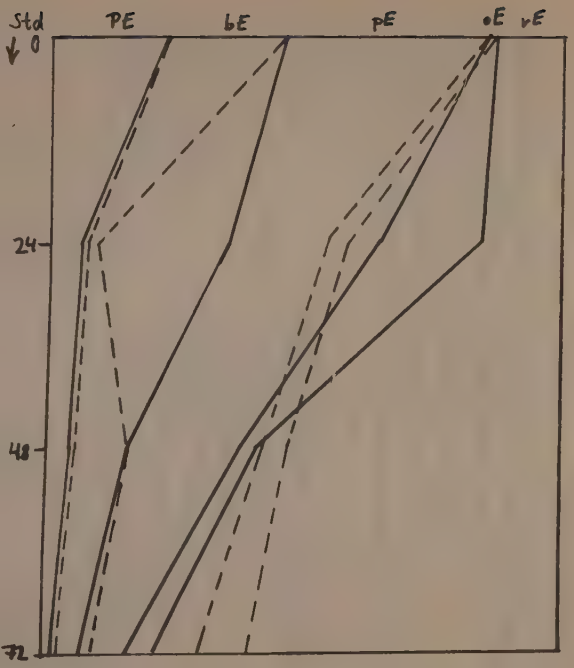
Die Hormonzusatzkulturen weisen einen sehr viel höheren Wert für den 24-Stunden-Ausstrich im Vergleich mit den Kontrollen auf. Auch hier steigt der ALP-Gesamtindex bis 48 Stunden und fällt dann etwas ab. Der 72-Stunden-Wert liegt jedoch ein wenig höher als der Gesamtindex für 24 Stunden (Tabelle 2).

Fall III: H. M., 48 Jahre

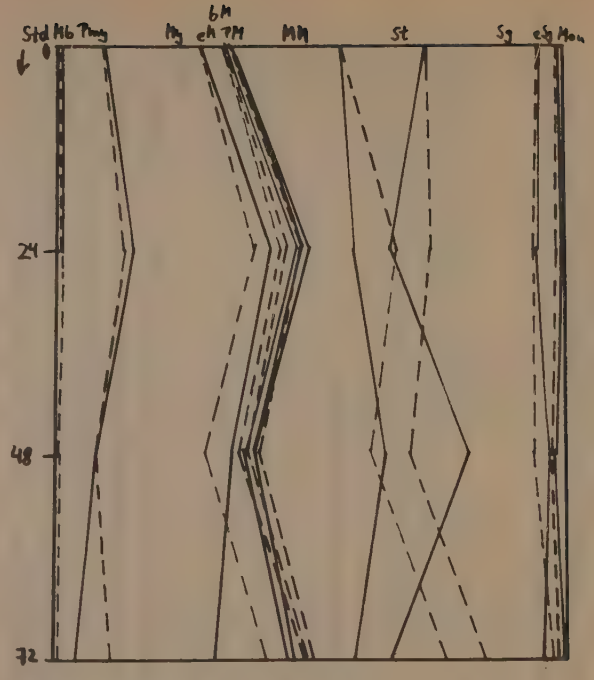
Klinische Diagnose: Toxische Leberschädigung, Zustand nach Coma hepaticum infolge Diphenylhydantoin und Tuberkulostatika (wegen verkäsender Halslymphknoten), Ulcus ventriculi mit Teerstühlen, primär chronische Polyarthritis.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

Dihydergot^{R} 3 x 15 Tropfen
Lanicor^{R} 0,25 mg
Atropin 3 x 0,5 mg



Fall III: H.M.



——— = Kontrolle

– – – – = Prednisolonacetat

Abb. 3

Phosphalugel^{R} 3 x 1 Eßlöffel/die
Kobalt-Ferrlecit 80 mg.

Blutbild am Tage der Sternalpunktion: Hb = 11,6 g%, Erythrocyten = 3,88 Mill./cmm, Hb_E = 30 pg, Retikulocyten = 56 %o, Thrombocyten = 220.000/cmm, Fe im Serum = 46,6 gamma-%, Leukocyten = 4.300/cmm.

Sternalpunktion: Gesteigerte und linksverschobene Erythropoese entsprechend der anbehandelten Eisenmangelanaemie, die Vermehrung der lymphoretikulären und plasmazellulären Elemente entspricht der Hepatopathie.

Man ersieht aus der Reifungskurve für die rote Reihe nach 24 Stunden, daß die Hormonzusatzkultur mehr reife Zellen aufweist als die entsprechende Kontrollkultur. Aber nach 48 Stunden findet man im Prednisolonacetat-Ausstrich wieder weniger reife Zellen als in der Kontrolle. Die verzögerte Reifung der Prednisolon-Kultur ist auch nach 72 Stunden durch Zurückbleiben hinter den Leerwerten noch deutlich zu erkennen (Abbildung 3). Es läßt sich also in der Erythropoese von einer verlangsamten Zellausreifung durch Prednisolonacetat sprechen, die statistisch signifikant ist (Tabelle 15).

In der Reifungskurve für die Granulocytopoese zeigt sich nach 24 Stunden eine geringere Anzahl reifer Zellen im Zusatzausstrich. Nach 48 Stunden ist die Menge der ausgereiften Granulocyten gegenüber der Kontrolle etwas vergrößert. Doch fällt im 72-Stunden-Ausstrich eine Vermehrung der unreifen Granuloblasten - besonders der Promyelocyten - unter Hormoneinfluß auf (Abbildung 3). Die Reifungsverzögerung in der weißen Reihe ist statistisch hoch signifikant (Tabelle 15).

Die G/E-Indices liegen in den Prednisolonacetat-Kulturen nach 24 und 48 Stunden etwas niedriger als in den Kontrollen.

Nach 72 Stunden findet man im Zusatzpräparat einen geringfügig höheren G/E-Index im Vergleich mit dem entsprechenden Kontrollindex (Tabelle 5).

Die Mitoseindices für die Erythropoese zeigen nach 24 und 48 Stunden nur eine geringe Differenz zwischen Kontroll- und Zusatzpräparat. Nach 72 Stunden liegt der Wert im Prednisolon-Ausstrich etwa um die Hälfte niedriger als in der Kontrolle (Tabelle 6).

Der granulocytopoetische Mitoseindex läßt nach 24 Stunden keinen Unterschied zwischen Kontrolle und Zusatz erkennen. Nur nach 48 Stunden steigt der Index unter Prednisolon-Einfluß erheblich an. Im 72-Stunden-Ausstrich ist - wie in der roten Reihe - im Zusatzpräparat die Mitoseaktivität stark abgeschwächt (Tabelle 7).

Ein hemmender Einfluß auf die Zellproliferation sowohl in der Erythropoese als auch in der Granulocytopoese läßt sich in diesem Fall erst nach 72 Stunden Kulturzeit eindeutig nachweisen.

Vergleicht man für diesen Fall die ALP-Indices, so findet man unter den retikulären Zellelementen nur große Retikulumzellen mit Aktivität im Original-Punktatausstrich. Der Gesamtindex für die Retikulumzellen steigt in den Kontrollpräparaten über 24 Stunden bis zum 48-Stunden-Ausstrich an. Nach 72 Stunden sinkt die Phosphataseaktivität etwas.

In den Kulturen mit Prednisolonacetat-Zusatz liegen die Indices nach 24, 48 und 72 Stunden höher als die entsprechenden Kontrollwerte für die retikulären Zellen.

Die relativ hohe Fermentaktivität der Myeloblasten und der Promyelocyten im Sofortausstrich der Granulocytopoese muß als Ausnahme gelten. Sie hängt möglicherweise mit dem chronischen Entzündungsprozess (Hepatitis, primär chronische Polyarthritis) dieser Patientin zusammen. Auch bei diesem Fall findet man ein kontinuierliches Ansteigen des ALP-Ge-

samtindex' bis zum 48-Stunden-Ausstrich der Kontrollversuche. Aber die Myeloblasten zeigen in allen weiteren Präparaten keine Aktivität mehr. Nach 72 Stunden sinkt die Fermentaktivität etwas, bleibt aber höher als zum 24-Stunden-Zeitpunkt.

Die Zellausstriche mit Prednisolon-Zusatz zeigen ebenfalls ein Ansteigen der ALP-Aktivität über 24 und 48 Stunden. Im 72-Stunden-Präparat sind auch hier niedrigere ALP-Indices zu verzeichnen. Alle Kulturen mit Zusatz weisen höhere Indices auf als die Kontrollen (Tabelle 3).

Tabelle 3: ALP-Indices/zugehörige Zellzahl

ALP-Indices bei den Kontrollen

	0 h	24 h	28 h	72 h
gr. Retikulumzellen	23/ 88	7/ 58	76/ 21	0/ 14
kl. Retikulumzellen	0/106	9/152	12/365	3/408
phag. Retikulumzellen	0/ 0	20/ 10	0/ 0	7/ 28
Gesamtindex	10/194	14/220	18/386	3/450
Myeloblasten	18/ 17	0/ 0	0/ 0	0/ 0
Promyelocyten	4/ 56	9/ 47	6/ 33	0/ 8
Myelocyten	0/127	25/182	5/290	0/181
Metamyelocyten	0/165	42/131	17/115	0/109
Stabkernige	0/184	45/ 75	87/ 77	0/119
Segmentkernige	8/266	37/349	64/112	9/217
Gesamtindex	3/815	18/784	28/627	4/634

ALP-Indices bei Prednisolonacetat-Zusatz

	24 h	48 h	72 h
gr. Retikulumzellen	58/ 45	72/ 28	12/113
kl. Retikulumzellen	8/167	11/106	5/265
phag. Retikulumzellen	0/ 9	73/ 11	0/ 10
Gesamtindex	18/221	28/145	7/388
Myeloblasten	0/ 6	0/ 3	0/ 7
Promyelocyten	0/ 63	0/ 42	0/ 32
Myelocyten	6/339	10/342	5/153
Metamyelocyten	19/114	71/ 65	10/107
Stabkernige	29/136	24/156	20/131
Segmentkernige	46/148	143/209	40/215
Gesamtindex	20/806	46/917	21/645

Fall IV: I. O., 83 Jahre

Klinische Diagnose: Sideroachrestische Anaemie.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

Valium^{R} 10 mg
Novalgin^{R} 20 Tropfen
Lanicor^{R} 3 x 0,25 mg/die.

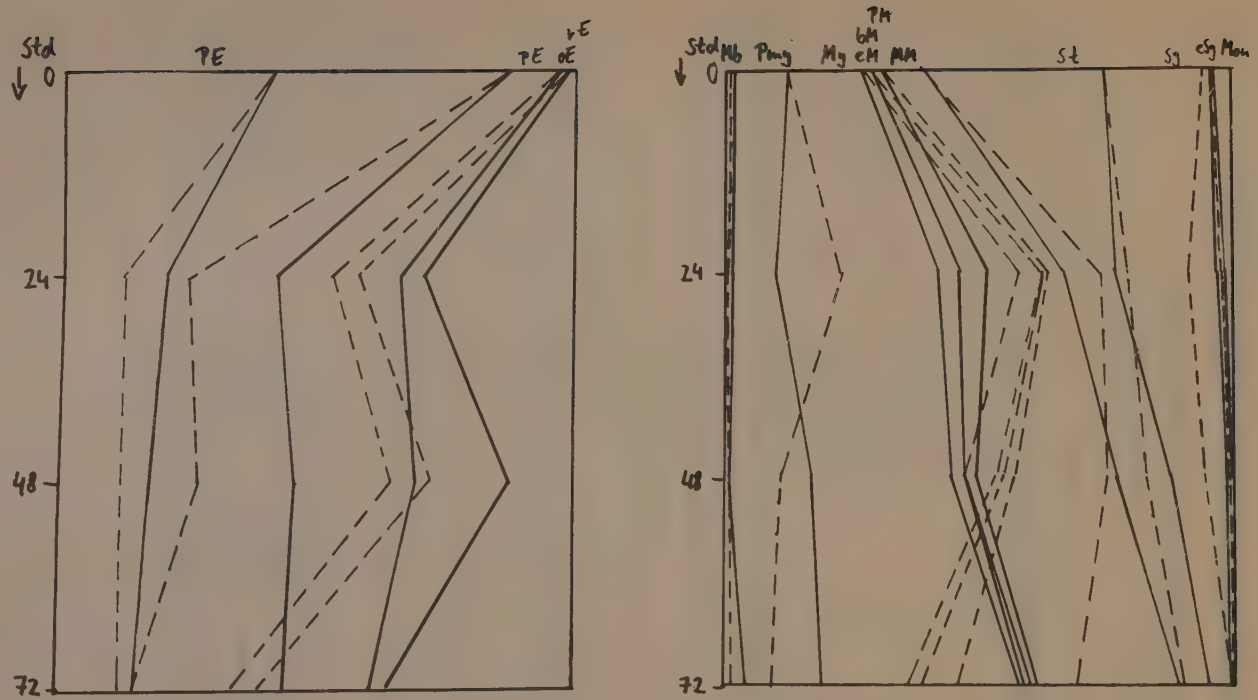
Blutbild am Tage der Sternalpunktion: Hb = 5,0 g%, Erythrocyten = 1,53 Mill./cmm, Hb_E = 32,9 pg, Thrombocyten = 242.000/cmm, Fe im Serum = 215,8 gamma-%, Leukocyten = 7.200/cmm, Basophile = 1 %, Eosinophile = 3 %, Stabkernige = 3 %, Segmentkernige = 70 %, Lymphocyten = 17 %, Monocyten = 6 %.

Sternalpunktion: Stark vermehrte und linksverschobene Erythropoese mit Vermehrung großer und kleiner Retikulumzellen. Massenhaft Eisenspeicherung im Retikulum.

In der erythropoetischen Reifungskurve stellt man nach 24 Stunden eine deutliche Vermehrung der reifen Zellen in der Prednisolon-Zusatzkultur fest. Die gleichen Auswirkungen des Hormons findet man in der 48-Stunden-Kultur und ebenfalls nach 72 Stunden (Abbildung 4).

Es läßt sich hier von einer signifikanten Reifungsförderung durch Prednisolonacetat sprechen (Tabelle 15).

Die Reifungskurve für die Granulocytopoese zeigt jedoch nach 24 Stunden Kultivierungszeit genau das Gegenteil: Eine Anhäufung unreifer Granuloblasten in der Zusatzkultur. Nach 48 Stunden gleichen sich Kontrollkultur und Zusatzkultur etwas an. Nach 72 Stunden kommt es in der Hormonkultur zu einer Zunahme der reiferen Zellarten (Abbildung 4).



Fall IV: J. O.

Abb. 4

Bei Vergleich der G/E-Indices sieht man ein Absinken der Werte in den Zusatzkulturen nach 24, 48 und 72 Stunden (Tabelle 5).

Die Mitoseindices in der Erythropoese (Tabelle 6) und in der Granulocytopoese (Tabelle 7) verhalten sich während der einzelnen Kulturzeiten uneinheitlich: Nach 48 Stunden liegen sie unter Prednisolonacetat-Einfluß über den Kontrollwerten, nach 72 Stunden dagegen unter den entsprechenden Kontrollwerten.

Zusammenfassend ist also eine signifikante Reifungsförderung bei nicht eindeutig veränderter Regeneration in der Erythropoese festzustellen (Tabelle 15).

Ein sicherer Einfluß des Prednisolonacetats auf die Proliferation der Granulocytopoese ist nicht abzulesen.

Für diesen Fall wurden keine Präparate zur Bestimmung der ALP-Aktivität angefertigt.

Fall V: W. R., 42 Jahre

Klinische Diagnose: Plasmocytom (Typ Gamma-A)

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

Vigantol^{R} 10 Tropfen
Ascorbinsäure 1,0 g/die.
Ca. 3 Monate vor der Punktion beginnend 2 x pro Woche 250 mg Stilbamidin.

Blutbild am Tage der Sternalpunktion: Hb = 13,2 g%, Erythrocyten = 4,13 Mill./cmm, Hb_E = 31,6 pg, Thrombocyten = 133.000/cmm, Leukocyten = 3.700/cmm, Eosinophile = 8 %, Stabkernige = 6 %, Segmentkernige = 54 %, Lymphocyten = 28 %, Monocyten = 4 %.

Sternalpunktion: Plasmazellvermehrung auf etwa 20 % der Gesamtzellen mit atypischen Plasmazellen wie bei Plasmocytom; ohne wesentliche Verdrängung der normalen Haematopoese. Auffallend: Plasmazellen mit Stilbamidin-granula.

Es wurden für diesen Fall keine Giemsa-Präparate ausgewertet. Die Untersuchung erfolgte nur an den ALP-Ausstrichen.

Bei der Beurteilung der ALP-Gesamtindices (Tabelle 4) erkennt man für die retikulären Zelltypen ein Ansteigen des Index in den Kontrollversuchen. Bei 48 Stunden liegt das Maximum der Phosphataseaktivität. Nach 72 Stunden findet man einen etwas erniedrigten Index, der aber über dem Wert des 24-Stunden-Ausstriches liegt.

Die Kulturansätze mit Prednisolonacetat zeigen etwa das gleiche Bild, nur daß die Werte hier insgesamt über den Kontroll-Indices liegen.

Auch für die Zellen der weißen Reihe ist die gleiche Tendenz zu vermerken: Zunahme der Fermentaktivität (ausgedrückt durch das Ansteigen des ALP-Index') bis zum 48-Stunden-Präparat. Danach sinkt der ALP-Index etwas ab, jedoch nicht unter den 24-Stunden-Wert.

In den Zusatzkulturen liegt der Gipfel der Phosphataseaktivität ebenfalls bei 48 Stunden, dem folgt ein geringer Abfall, der auch hier nicht unter dem 24-Stunden-Index reicht. Alle drei Werte für die Zusatzkulturen liegen höher als die entsprechenden Kontrollindices.

Tabelle 4: ALP-Indices/zugehörige Zellzahl

ALP-Indices bei den Kontrollen

	0 h	24 h	48 h	72 h
gr. Retikulumzellen	19/140	33/ 67	21/ 91	56/ 45
kl. Retikulumzellen	12/189	15/218	53/351	26/405
phag. Retikulumzellen	0/ 15	0/ 35	0/ 51	0/ 51
Gesamtindex	14/344	18/320	42/493	22/501
Myeloblasten	0/ 3	0/ 5	0/ 0	0/ 0
Promyelocyten	0/ 12	32/ 25	30/ 17	10/ 39
Myelocyten	23/198	65/256	116/216	50/172
Metamyelocyten	45/162	59/144	120/ 60	96/ 67
Stabkernige	56/167	87/168	154/100	130/ 75
Segmentkernige	65/152	85/148	130/ 95	142/137
Gesamtindex	45/694	70/746	124/488	91/490

ALP-Indices bei Prednisolonacetat-Zusatz

	24 h	48 h	72 h
gr. Retikulumzellen	35/ 72	40/119	37/125
kl. Retikulumzellen	30/127	42/329	21/145
phag. Retikulumzellen	0/ 43	65/37	7/ 27
Gesamtindex	26/242	43/485	27/297
Myeloblasten	0/ 2	0/ 0	0/ 0
Promyelocyten	0/ 8	33/ 15	35/ 23
Myelocyten	38/144	117/180	83/124
Metamyelocyten	81/192	153/ 75	94/120
Stabkernige	79/181	196/ 80	100/163
Segmentkernige	93/235	214/132	146/278
Gesamtindex	75/764	159/482	112/708

Die G/E-Indices (Tabelle 5): Die Mittelwerte der 4 Fälle liegen beim Originalausstrich und nach 24 Stunden etwa auf gleicher Höhe. Die Werte nach 48 und 72 Stunden liegen unter den Ausgangswerten. Da der extrem hohe Wert bei Fall IV das Gesamtbild verfälscht, wurde dieser Wert nach 48 Stunden in Klammern gesetzt und der Mittelwert einmal mit und einmal ohne diesen errechnet.

Beim Vergleich mit den G/E-Indices, die sich bei den Kulturen mit Prednisolonacetat ergaben, fällt auf, daß die Werte hier niedriger als bei den Kontrollansätzen liegen, ansonsten aber die gleiche bis 48 Stunden ansteigende und danach wieder abfallende Tendenz zeigen. Auch hier liegt der Wert für den 72-Stunden-Ausstrich unter dem von 24 Stunden.

Die Abnahme der Indexhöhe unter Einfluß von Prednisolonacetat entspricht der festgestellten Reifungshemmung in der Erythropoese.

Tabelle 5: G/E-Indices

	Kontrollen				Prednisolonacetat		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	1,12	0,82	0,58	0,41	0,65	0,53	0,23
II	3,78	2,85	3,68	2,56	2,24	3,54	2,30
III	1,39	2,68	1,22	0,50	1,13	0,91	0,95
IV	2,73	1,87	(17,60)	3,74	1,43	3,34	1,19
Summe	9,02	8,22	5,48 (23,08)	7,21	5,45	8,32	4,67
Mittelwert	2,26	2,06	1,83 (5,77)	1,80	1,36	2,08	1,17

Die Mitoseindices (Tabelle 6 und 7), die als Zeichen der Regenerationsleistung des Knochenmarkes gelten, lassen eine hemmende Wirkung des zugesetzten Prednisolonacetats erkennen.

In der Erythropoese (Mittelwert der 4 Fälle) findet man einen Anstieg der Mitoserate bis zur 24-Stunden-Kultur. Nach 48 Stunden ist der Mitoseindex in den Kontrollkulturen verringert, steigt aber in den 72-Stunden-Ausstrichen wieder etwas an.

In den Kulturen mit Hormonzusatz sieht man eine Zunahme der Mitosehäufigkeit bis 72 Stunden. Die Indices liegen jedoch alle niedriger als die entsprechenden Kontrollwerte.

Für die granulocytopoetischen Zellen (Mittelwerte der 4 Fälle) ergibt sich in den Kontrollen ein Abfall der Mitoseindices von 0 über 24 Stunden bis zum 48-Stunden-Ausstrich. Danach steigt die Mitoserate wieder an.

Die Prednisolon-Kulturen zeigen - wie schon bei Betrachtung der Mitoseindices der roten Reihe auffällt - auch niedrigere Werte als die Kontrollansätze. Es läßt sich also eine Verminderung der Mitoseaktivität durch den Prednisolon-Zusatz feststellen. Das Ansteigen der Mitoserate bis 72 Stunden findet man auch hier; der Anstieg ist aber geringer als in der Erythropoese.

Anhand der verringerten Mitosehäufigkeit in den Kulturen mit Prednisolonacetat läßt sich die zellteilungshemmende Wirkung des Hormons ablesen.

Tabelle 6: Mitoseindices für die Erythropoese in %o

Fall	Kontrollen				Prednisolonacetat		
	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	21,4	63,9	0	34,0	6,76	0	44,2
II	40,0	26,2	36,2	0	11,6	17,0	10,1
III	28,4	9,85	15,3	26,2	7,95	17,95	13,5
IV	12,0	10,7	0	26,7	8,38	8,87	0
Summe	101,8	110,65	51,5	86,9	34,69	43,82	67,8
Mittel-wert	20,5	27,66	12,88	21,7	8,76	10,96	17,0

Tabelle 7: Mitoseindices für die Granulocytopoese in %o

Fall	Kontrollen				Prednisolonacetat		
	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	29,2	11,4	5,1	33,5	8,1	0	35,0
II	6,85	15,0	5,3	13,6	1,57	4,67	7,1
III	8,4	10,9	3,9	23,9	9,26	17,1	7,26
IV	9,55	10,5	4,42	7,8	15,9	11,4	0
Summe	54,00	47,8	18,72	78,8	34,83	33,17	49,36
Mittel-wert	13,50	11,95	4,68	19,7	8,71	8,29	12,34

Tabelle 8: ALP-Gesamtindices der Retikulumzellen

	Kontrollen				Prednisolonacetat		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	3/586	5/274	161/137	11/580	50/237	75/675	68/636
II	9/228	13/433	20/436	167/551	29/224	81/371	4/ 96
III	10/194	14/220	18/386	3/450	18/221	28/145	7/388
V	14/344	18/320	42/493	22/501	26/242	43/485	27/297
Summe	36/1352	50/1247	241/1452	203/2082	123/924	227/1676	106/1417
Mittelwert	9/338	13/312	60/366	51/621	31/231	57/419	27/354

Vergleicht man die Mittelwerte der ALP-Indices der Retikulumzellen (große, kleine und phagocytierende) in den Kontrollen mit den Werten der Zusatzpräparate, so sieht man nur nach 24 Stunden eine Erhöhung des ALP-Index' unter Prednisolonacetat. Nach 48 und 72 Stunden liegen die Indices in den Hormonkulturen unter denen der Kontrollen. Die stärkste Aktivität der alkalischen Leukocytenphosphatase findet man in den Kontrollen und in den Zusatzpräparaten jeweils nach 48 Stunden (Tabelle 8).

Tabelle 9: ALP-Gesamtindices der Granulocyten

	Kontrollen				Prednisolonacetat		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	13/429	38/750	140/734	77/388	44/655	203/559	166/301
II	17/884	101/571	134/638	240/505	108/796	155/619	111/906
III	3/815	18/784	28/627	4/634	20/806	46/917	21/645
V	45/694	70/746	124/488	91/490	75/764	159/482	112/708
Summe	78/2822	227/2851	426/2487	412/2017	247/3021	563/2577	410/2560
Mittelwert	20/755	57/713	107/622	103/504	62/755	141/644	103/640

Die Mittelwerte der ALP-Indices der Granulocyten zeigen unter Prednisolonacetat-Einfluß nach 24 und 48 Stunden eine Zunahme der Fermentaktivität. Nach 72 Stunden liegt die Phosphataseaktivität in den Kontrollen und in den Zusatzpräparaten gleich hoch. Die höchsten Indices findet man in den Kontrollen und in den Prednisolon-Kulturen nach 48 Stunden (Tabelle 9).

Tabelle 10: Anzahl der kleinen Retikulumzellen in %

Fall	Kontrollen				Prednisolonacetat		
	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	15,4	6,4	17,3	10,8	10,4	19,3	19,8
II	5,8	0,5	13,9	6,4	8,5	13,6	15,0
III	13,5	21,6	15,6	34,5	16,4	14,6	14,7
IV	6,4	15,0	22,7	23,3	10,7	14,7	13,3
Summe	41,1	43,5	69,5	75,0	46,0	62,2	62,8
Mittel-wert	10,3	10,9	17,4	18,8	11,5	15,6	15,7

Tabelle 11: Anzahl der großen Retikulumzellen in %

Fall	Kontrollen				Prednisolonacetat		
	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	4,2	1,0	1,9	4,8	2,1	1,4	2,3
II	5,1	13,2	2,2	4,9	2,8	5,2	6,1
III	3,4	5,2	4,0	7,0	3,9	4,5	3,4
IV	7,0	11,0	7,7	16,3	3,1	4,5	14,3
Summe	19,7	30,4	15,8	33,0	11,9	15,6	26,1
Mittel-wert	4,9	7,6	4,0	8,3	3,0	3,9	6,5

Tabelle 12: Anzahl der phagocytierenden Retikulumzellen in %

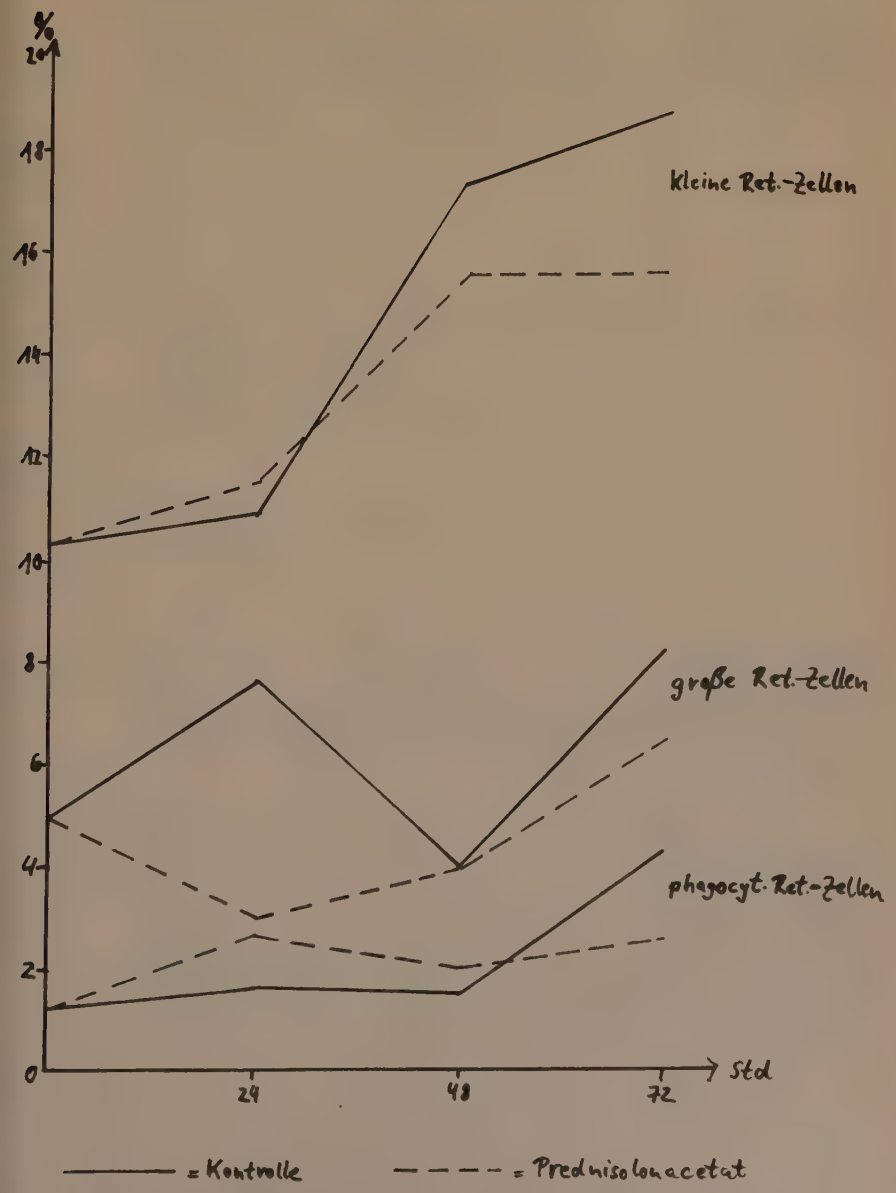
Fall	Kontrollen				Prednisolonacetat		
	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	3,2	1,5	1,6	8,1	3,7	3,0	4,1
II	0,2	0,1	2,9	2,0	1,5	1,8	3,4
III	0,8	3,2	0,6	4,5	2,8	1,2	1,1
IV	0,4	1,7	0,9	2,4	2,3	2,1	1,8
Summe	4,6	6,5	6,0	17,0	10,3	8,1	10,4
Mittelwert	1,2	1,6	1,5	4,3	2,6	2,0	2,6

Bei Betrachtung der graphischen Darstellung und der Tabelle für die Mittelwerte der retikulären Zellen in den Fällen I bis IV fällt für die kleinen Retikulumzellen eine Vermehrung über 24 und 48 bis 72 Stunden auf. Der Anstieg der Zellzahlen in den Zusatzversuchen bleibt aber nach 48 Stunden und besonders nach 72 Stunden signifikant hinter dem Anstieg in den Kontrollen zurück (Tabelle 10 und 15, Abbildung 5).

Die Kurve für die großen Retikulumzellen zeigt nach 24 Stunden eine starke Zellvermehrung in den Kontrollen, eine Verringerung der Zellzahlen in den Prednisolon-Kulturen (signifikanter Unterschied!). Nach 48 Stunden liegen beide Werte annähernd auf gleicher Höhe. Nach 72 Stunden findet man im Zusatzpräparat signifikant weniger Zellen als in der Kontrolle (Tabelle 11 und 15, Abbildung 5).

Abb. 5

Mittelwerte der Retikulumzellen



Die Vermehrung der phagocytierenden Retikulumzellen ist über 24 und 48 Stunden annähernd gleich in den Kontrollen und Zusatzkulturen. Erst nach 72 Stunden sieht man die signifikante Hemmung der Zellvermehrung gegenüber den Kontrollen (Tabelle 12 und 15, Abbildung 5).

Tabelle 13: Anzahl der Lymphoblasten in %

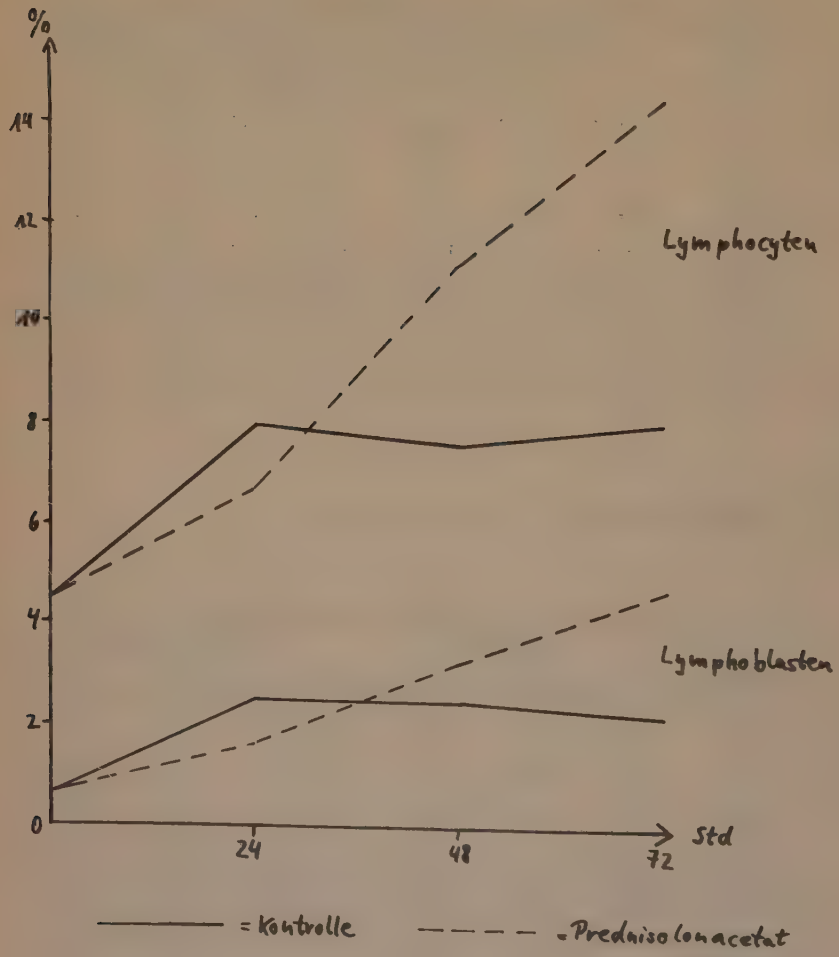
	Kontrollen				Prednisolonacetat		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	0,27	2,03	1,92	3,2	1,74	7,42	4,78
II	1,25	4,47	4,53	2,68	2,98	2,33	2,47
III	0,0	1,51	1,1	0,14	0,28	1,15	1,15
IV	0,98	1,85	2,39	2,66	1,57	1,96	9,05
Summe	2,50	9,86	9,94	8,68	6,57	12,86	17,45
Mittel-wert	0,63	2,47	2,49	2,17	1,64	3,22	4,36

Tabelle 14: Anzahl der Lymphocyten in %

	Kontrollen				Prednisolonacetat		
Fall	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	3,19	20,9	9,0	12,8	5,0	16,8	18,3
II	4,29	5,42	10,1	12,05	11,8	9,0	10,4
III	8,2	2,36	5,52	3,84	5,63	9,1	9,3
IV	2,04	3,0	5,22	3,04	4,26	8,9	14,6
Summe	17,72	31,68	29,84	31,73	26,69	43,8	52,6
Mittel-wert	4,43	7,92	7,46	7,93	6,67	10,95	13,15

Abb. 6

Mittelwerte der lymphatischen Zellen



Die relative Gesamtzahl der Lymphocyten in den Kontrollkulturen steigt vom Zeitpunkt 0 Stunden bis 24 Stunden an (Tabelle 14). Ebenso verhalten sich die Lymphoblasten (Tabelle 13). Zu den folgenden Zeiten bleibt die Zellzahl bei beiden Arten etwa gleich.

Beim Vergleich mit den Kulturen mit Prednisolonacetat-Zusatz findet man ebenfalls ein Ansteigen der relativen Zellzahlen für beide Zellgruppen. Doch dieser Anstieg geht über 24 Stunden hinaus und hält selbst nach 72 Stunden noch an (Abbildung 6).

Die Lymphoblasten- und Lymphocytenvermehrung bei 72 Stunden ist statistisch signifikant (Tabelle 15).

Die karyologische Kurve der Erythropoese (Abbildung 7) zeigt in den Kontrollversuchen gegenüber der "normalen" Kurve relativ viele Prophasen und frühe Metaphasen. Die späten Metaphasen, Telophasen und Anaphasen liegen zahlenmäßig niedriger. Die Häufigkeit der Rekonstruktionsphasen liegt annähernd auf gleicher Höhe mit den Prophasen.

In den Prednisolon-Zusatzkulturen findet man das Maximum der Kurve bei den frühen Metaphasen. Den tiefsten Punkt erreicht die Kurve bei den Anaphasen und steigt danach wieder an.

Für die Granulocytopoese gleicht die Kurve (Abbildung 8) in den Kontrollen dem Durchschnittsbild sonstiger karyologischer Kurven. Man sieht ein Ansteigen der Kurve mit dem Maximum für die späten Metaphasen. Danach fällt die Kurve ab; sie hat ihr Minimum bei den Telophasen. Die Häufigkeit der Rekonstruktionsphasen liegt mit den Prophasen etwa auf einer Höhe.

In den Zusatzkulturen liegt das Kurvenmaximum ebenfalls bei den späten Metaphasen. Das Auftreten dieser Mitosephase übersteigt jedoch das der Kontrollen. Es folgt ein Ab-

Karyologische Kurve

Abb. 7

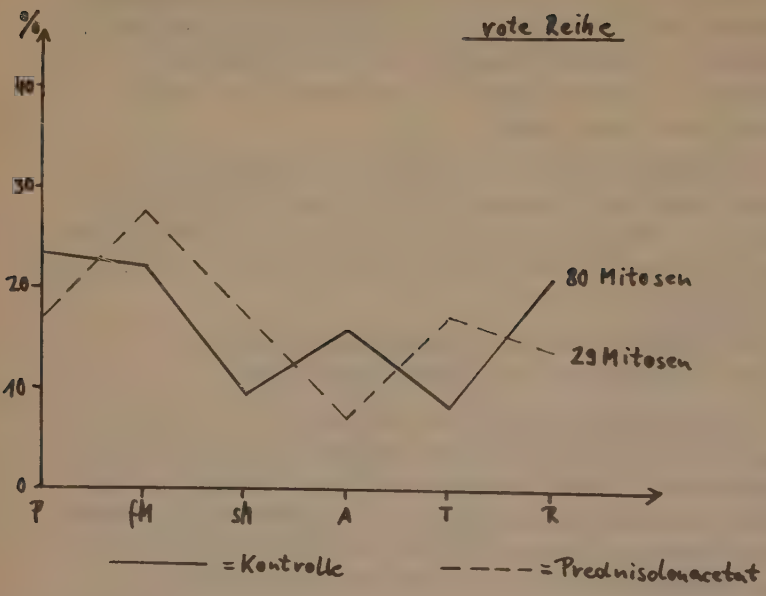
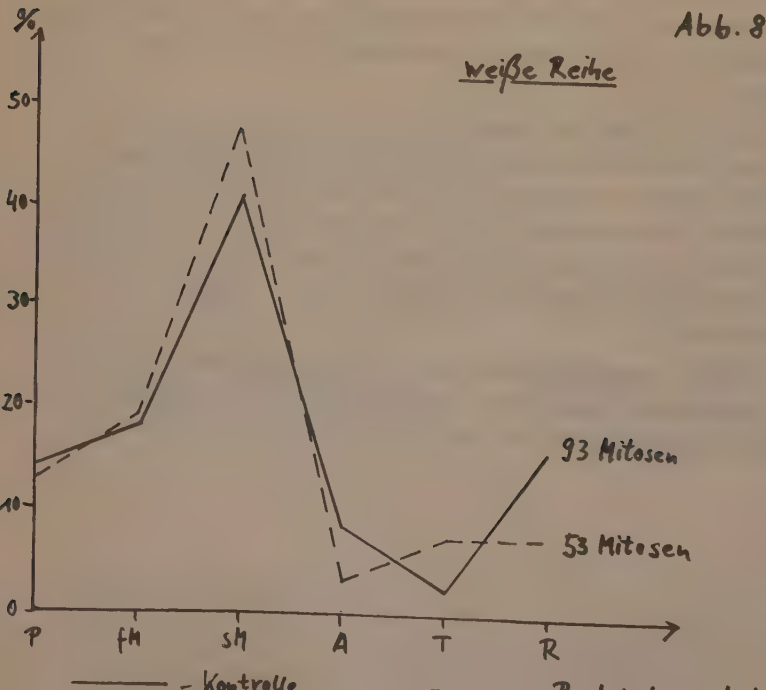


Abb. 8



sinken der Kurve bei den Anaphasen, die etwa auf gleicher Höhe mit den Telophasen liegen.

Insgesamt ist keine wesentliche Beeinflussung der karyologischen Kurven durch Prednisolonacetat abzulesen.

STATISTISCHE AUSWERTUNG

Aus dem vorhandenen Zahlenmaterial läßt sich eine Ausreifungshemmung der roten und weißen Zellen in der Mehrzahl der Fälle ablesen. Da aber in einem Fall auch eine beschleunigte Ausreifung unter Prednisolonacetat-Einfluß erkennbar ist, kann man eine Aussage nur im Sinne der Wahrscheinlichkeitstheorie machen.

Unter Zuhilfenahme des χ^2-Testes nach FISHER soll entschieden werden, ob die Reifungshemmung in den Kulturen mit Prednisolonacetat als zufällig anzusehen ist oder ob mit großer Wahrscheinlichkeit tatsächlich ein Unterschied zu den Kontrollkulturen vorhanden ist.

Der Test wird für alle Werte der Fälle I - IV, bei denen ein Unterschied zwischen Kontroll- und Zusatzpräparat in Richtung einer Ausreifungshemmung vorliegt, für die Differentialverteilung angewendet. Eine nähere Erläuterung des χ^2-Testes findet man bei BELITZ[2] und CAVALLI-SFORZA[6].

Der χ^2-Test wird ebenfalls zur Signifikanzberechnung der retikulären Zellen und der lymphatischen Zellen in den Zusatzkulturen herangezogen.

Auch die Abnahme der Mitoseindices in den Kulturen mit Prednisolonacetat wird mit Hilfe des χ^2-Testes auf Signifikanz untersucht.

Nachstehend sind für die Anwendung des χ^2-Testes zwei Beispiele aufgeführt (Tabelle 15). Für den jeweils errechneten χ^2-Wert wird dann aus einer logarithmischen Kurve unter Berücksichtigung der entsprechenden Freiheitsgrade der Wahrscheinlichkeitswert p abgelesen. Wenn dieser Wert p kleiner als 0,01 ist, spricht man statistisch von Signifikanz.

Es folgen ebenfalls in Tabelle 15 die Berechnungen von χ^2 für die einzelnen Stichproben mit den dazugehörigen Werten für p.

Beispiel für die Signifikanzberechnung

Fall IV Erythropoese 24h

Zelltyp	Kontrolle	Zusatz	Kontr. + Zusatz	p
PE	92	81	173	0,1550
bE	101	82	183	0,1640
pE	158	182	340	0,3050
oE	21	33	54	0,0485
rE	91	272	363	0,3260
	$n_1 = 463$	$n_2 = 650$	$n_{ges.} = 1113$	$\approx 1{,}000$

Zelltyp	$E_{Kontrolle}$	E_{Zusatz}	$(B-E)^2/E_{Kontrolle}$	$(B-E)^2/E_{Zusatz}$
PE	71,8	101,0	5,690	4,040
bE	76,0	106,5	8,220	5,860
pE	141,0	198,2	2,050	1,460
oE	22,4	31,5	0,087	0,062
rE	150,5	211,5	2,350	1,675
	$n_1 \approx 463$	$n_2 \approx 650$	$\chi^2_4 = 18{,}397$	$\chi^2_4 = 13{,}097$

$$\chi^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E}$$

	$(B-E)^2/E_{ges.}$
PE	9,730
bE	14,080
pE	3,510
oE	0,149
rE	4,025
	$\chi^2_4 = 31{,}494$

$p = 5 \cdot 10^{-5}$ signifikant

E = Erwartungswert $= p \cdot n_1$

B = Beobachtungswert

p = Wahrscheinlichkeitswert = $\frac{\text{Kontr. + Zusatz}}{n_{ges.}}$

Tabelle 15.1

Fall I — rote Reihe

24 h				48 h			
Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$	Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	6	64	34,3	PE	6	18	9,22
bE	18	62	14,3	bE	21	7	4,22
pE	49	101	7,2	pE	57	15	27,52
oE	21	69	14,9	oE	61	26	7,19
rE	681	711	1,6	rE	719	616	2,72
$n_1 = 775$	$n_2 = 1007$	$\chi^2_4 = 72,3$		$n_1 = 864$	n_2 682	$\chi^2_4 = 50,87$	
$p < 10^{-10}$ (signifikant)				$p = 3 \cdot 10^{-10}$			

72 h			
Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
oE	15	26	2,77750
Rest	836	799	0,0611
$n_1 = 851$	$n_2 = 825$	$\chi^2_1 = 2,836$	
$p = 0,085$ (nicht signifik.)			

weiße Reihe

24 h			
Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
Myeloc.	94	140	4,326
Rest	536	515	0,959
$n_1 = 630$	$n_2 = 655$	$\chi^2_1 = 5,285$	
$p \approx 0,02$ (nicht signifik.)			

Tabelle 15.2

Fall II — rote Reihe

24 h

Zelltyp	kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
bE	40	71	0,5740
rE	134	181	1,318
Rest	113	187	0,0144

$n_1 = 287$ $n_2 = 439$ $\chi^2_2 = 1,906$

$p = 0,39$ (nicht signifik)

48 h

Zelltyp	kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	19	57	18,130
bE	33	26	1,058
rE	210	184	2,779
Rest	31	35	0,120

$n_1 = 293$ $n_2 = 302$ $\chi^2_3 = 22,087$

$p = 6 \cdot 10^{-5}$ (signifik)

72 h

Zelltyp	kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
bE	16	54	24,110
pE	57	31	5,520
Rest	342	295	0,649

$n_1 = 415$ $n_2 = 380$ $\chi^2_2 = 30,279$

$p = 4 \cdot 10^{-7}$ (signifikant)

Weiße Reihe

48 h

Zelltyp	kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
Promy.	116	248	4,902
Myeloc.	417	361	3,602
Eos. "	64	23	18,970
Meta-M.	156	199	5,570
Stabk.	71	98	4,941
Segm.	182	87	3,294
Eos. "	54	17	19,090
Rest	17	33	5,245

$n_1 = 1077$ $n_2 = 1066$ $\chi^2_7 = 65,614$

$p < 10^{-10}$ (signifik.)

72 h

Zelltyp	kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
Eos Myeloc.	48	4	32,620
Meta "	178	198	8,450
Stabk.	52	73	8,910
Eos. Segm.	93	8	28,420
Rest	690	592	0,616

$n_1 = 1061$ $n_2 = 875$ $\chi^2_4 = 79,016$

$p < 10^{-10}$ (signifikant)

Tabelle 15.3

Fall III

rote Reihe

48h				72h			
Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$	Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
bE	80	50	10,70	pE	62	155	35,85
pE	145	224	10,15	oE	40	78	10,75
Rest	423	450	0,55	rE	567	454	16,49
				Rest	51	64	0,96
$n_1 = 648$	$n_2 = 724$	$\chi^2_2 = 21,4$		$n_1 = 720$	$n_2 = 751$	$\chi^2_3 = 64,05$	
$p = 2,5 \cdot 10^{-5}$ (signifik.)				$p < 10^{-10}$ (signifik.)			

weiße Reihe

24h				72h			
Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$	Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
Myeloc.	265	209	0,545	Promy.	12	75	14,96
Meta-M.	95	164	2,400	Eos. Myeloc.	50	49	13,11
Stab k.	68	47	1,099	Meta- "	44	190	22,22
Segm.	282	169	7,675	Segment.	107	95	34,65
Rest	235	208	0,227	Eos. "	16	8	12,06
				Rest	127	295	2,09
$n_1 = 945$	$n_2 = 797$	$\chi^2_4 = 41,946$		$n_1 = 356$	$n_2 = 712$	$\chi^2_5 = 99,09$	
$p = 3 \cdot 10^{-8}$ (signifik.)				$p < 10^{-10}$ (signifik.)			

Tabelle 15.4

Fall IV — rote Reihe

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	92	81	9,1730
bE	101	82	14,080
pE	158	182	3,510
oE	21	33	0,149
yE	91	272	4,025

$n_1 = 463$ $n_2 = 650$ $\chi^2_4 = 31,494$

$p = 2,5 \cdot 10^{-6}$ (signifik.)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
PE	12	41	1,521
bE	19	44	7,210
pE	16	119	3,176
oE	12	22	7,120
yE	9	90	5,550

$n_1 = 68$ $n_2 = 316$ $\chi^2_4 = 24,577$

$p = 6 \cdot 10^{-5}$ (signifik)

72 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
pE	36	30	2,280
Rest	195	102	0,615

$n_1 = 231$ $n_2 = 132$ $\chi^2_1 = 2,895$

$p = 0,09$ (nicht signifik)

weiße Reihe

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
Promy.	80	205	3,172
Myeloc.	283	322	0,424
Meta-«	129	97	7,280
Stabk.	101	54	17,750
Segm.	170	114	1,739
Rest	105	140	2,607

$n_1 = 868$ $n_2 = 932$ $\chi^2_5 = 32,972$

$p = 3 \cdot 10^{-6}$ (signifik.)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
Promy.	203	111	1,746
Myeloc.	323	383	1,848
Meta-«	323	209	1,266
Stabk.	135	71	12,440
Eos. Segm.	9	42	25,500
Rest	191	237	1,149

$n_1 = 1184$ $n_2 = 1053$ $\chi^2_5 = 43,949$

$p = 3 \cdot 10^{-8}$ (signifik.)

Tabelle 15. 5

χ^2-Test für die großen Retikulumzellen

24 h				72 h			
Fall	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$	Fall	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
I	20	46	50,90	I	99	47	0,007
II	265	57	20,85	II	100	124	53,350
III	99	83	23,67	III	148	72	0,004
IV	220	63	6,49	IV	343	90	27,200
	$n_1 = 604$	$n_2 = 249$	$\chi^2_3 = 101,91$		$n_1 = 690$	$n_2 = 333$	$\chi^2_3 = 80,561$
	$p < 10^{-10}$ (signifikant)				$p < 10^{-10}$ (signifik)		

Kleine Retikulumzellen 72 h				phagocytierende Retikulumzellen 72 h			
Fall	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$	Fall	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
I	223	402	161,50	I	168	82	0,068
II	131	239	97,10	II	49	50	22,920
III	735	306	41,95	III	93	22	8,710
IV	492	84	149,90	IV	50	11	5,480
	$n_1 = 1581$	$n_2 = 1031$	$\chi^2_3 = 450,45$		$n_1 = 351$	$n_2 = 165$	$\chi^2_3 = 37,178$
	$p < 10^{-10}$ (signifik)				$p = 3 \cdot 10^{-7}$		

χ^2-Test für

Lymphoblasten 72 h				Lymphocyten 72 h			
Fall	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$	Fall	Kontr.	Zusatz	$(B-E)^2/E$
I	66	97	0,800	I	264	371	0,268
II	54	50	2,675	II	242	210	22,150
III	3	24	11,860	III	74	194	2,442
IV	56	57	7,276	IV	64	92	0,162
	$n_1 = 179$	$n_2 = 228$	$\chi^2_3 = 22,60$		$n_1 = 644$	$n_2 = 867$	$\chi^2_3 = 25,02$
	$p = 5 \cdot 10^{-4}$ (signifik)				$p = 9,5 \cdot 10^{-4}$ (signifik		

Tabelle 15.6

Anwendung des χ^2-Testes für die Signifikanzberechnung der Mitosen (Rechnungsbeispiel)

24h rote Reihe

	Ko	Zu
I	6 - 775	2 - 1007
II	4 - 287	3 - 439
III	3 - 366	3 - 704
IV	4 - 463	2 - 650
	B_M: 17 B_{M+N}: 1891	B_M: 10 B_{M+N}: 2800

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Ko	17	1874	1891	10,9	1880,1
Zu	10	2790	2800	16,1	2783,9
Su	27		4691		

Ko:

$$E_M = \frac{27 \cdot 1891}{4691} = 10{,}9$$

$$E_N = 1891 - 10{,}9 = 1880{,}1$$

Ko = Kontrolle

Zu = Zusatz

Su = Summe

B_M = Beobachtungswert Mitosen

B_N = Beobachtungsw. „Nicht-Mitosen"

E_M = Erwartungswert Mitosen

E_N = Erwartungswert „Nicht-Mitosen"

B_{M+N} = Beobachtungsw. Mitosen + „Nicht-Mitosen"

$E_M = \frac{\text{Summe d. Mitosen}}{\text{Summe d. Gesamtzellzahl}}$ multipliziert mit B_{M+N}

$E_N = B_{M+N} - E_M$

p = Wahrscheinlichkeitswert

Zu: $E_M = \frac{27 \cdot 2800}{4691} = 16{,}1$; $E_N = 2800 - 16{,}1 = 2783{,}9$

Ko: $B_M - E_M = 6{,}1$ $\quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{37{,}2}{10{,}9} = 3{,}4$

$B_N - E_N = 6{,}1$ $\quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{37{,}2}{1880{,}1} = 0{,}019$

Zu: $B_M - E_M = 6{,}1$ $\quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{37{,}2}{16{,}1} = 2{,}35$

$B_N - E_N = 6{,}1$ $\quad \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{37{,}2}{2783{,}9} = 0{,}013$

$$\chi^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E}$$

$\chi^2_1 = 5{,}782$

$p = 0{,}015$

Tabelle 15. 7

Signifikanzberechnung der Mitosen

24 h rote Reihe

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Ko	17	1874	1891	16,9	1880,1
Zu	10	2790	2800	16,1	2783,9
Su	27		4691		

$$\chi^2_1 = \frac{\sum (B-E)^2}{E} = 5,782$$

$p = 0,015$ (nicht signifikant)

24 h weiße Reihe

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Ko	27	2200	2227	23,6	2203,4
Zu	21	2296	2317	24,5	2292,5
Su	48		4544		

$$\chi^2_1 = \frac{\sum (B-E)^2}{E} = 0,8985$$

$p = > 0,1$ (nicht signifikant)

48 h

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Ko	7	1866	1873	8,16	1864,84
Zu	10	2014	2024	8,82	2015,18
Su	17		3897		

$$\chi^2_1 = \frac{\sum (B-E)^2}{E} = 0,321$$

$p > 0,1$ (nicht signifikant)

48 h

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Ko	12	2555	2567	16,9	2550,1
Zu	20	2272	2292	15,2	2276,8
Su	32		4859		

$$\chi^2_1 = \frac{\sum (B-E)^2}{E} = 2,949$$

$p = 0,185$ (nicht signifikant)

72 h

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Ko	10	2207	2217	9,3	2207,7
Zu	8	2080	2088	8,75	2079,25
Su	18		4305		

$$\chi^2_1 = \frac{\sum (B-E)^2}{E} = 0,109$$

$p > 0,1$ (nicht signifikant)

72 h

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Ko	27	1824	1851	23,3	1827,7
Zu	13	1324	1337	16,7	1320,3
Su	40		3188		

$$\chi^2_1 = \frac{\sum (B-E)^2}{E} = 1,427$$

$p > 0,1$ (nicht signifikant)

Tabelle 15.8

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In der Erythropoese wurde die Zellausreifung durch Zusatz von 0,25 µg/ml Prednisolonacetat in 3 von 4 Fällen mäßiger Anaemien signifikant gehemmt (Tabelle 15). Die Reifungshemmung ist aus den Reifungskurven (Abbildung 1, 2 und 3) und den G/E-Indices dieser Fälle (Tabelle 5) ersichtlich.

Eine Regenerationshemmung in den 3 Fällen läßt sich aus den Mitoseindices der roten Reihe (Tabelle 6) und den karyologischen Kurven (Abbildung 7) ablesen.

Der 4. Fall war eine sideroachrestische Anaemie und zeigte eine Förderung der Zellausreifung (Abbildung 4).

In der Granulocytopoese wurde die Reifung der Zellen durch den Prednisolonacetat-Zusatz in 2 der 4 Fälle signifikant gehemmt. In den Fällen I und IV war keine eindeutige Veränderung durch Prednisolon zu erkennen.

Die Regeneration war in 2 Fällen vermindert, in 2 Fällen nicht sicher beeinflußt (Tabelle 7 und Abbildung 7).

Die ALP-Indices wurden für 4 der insgesamt 5 Fälle berechnet und zeigten eine Steigerung der Phosphataseaktivität unter Prednisolonacetat-Einfluß in allen Fällen der granulocytopoetischen Zelltypen. Selbst Zellarten, die in den Kontrollen keine Fermentaktivität aufwiesen, ließen unter Corticosteroid-Einfluß Aktivität erkennen (Tabelle 8 und 9).

Im Retikulum wurde unter Prednisolonacetat nach 48 und 72 Stunden eine signifikante Erniedrigung der relativen Zellzahlen bei den kleinen Retikulumzellen gesehen. Die großen Retikulumzellen waren schon nach 24 Stunden unter Hormoneinfluß signifikant vermindert, erreichten bei 48

Stunden etwa den gleichen Wert wie in den Kontrollen und waren nach 72 Stunden in den Zusatzpräparaten signifikant verringert (Abbildung 5, Tabelle 10, 11, 12 und 15).

Die für die großen, kleinen und phagocytierenden Retikulumzellen berechneten ALP-Indices ließen gegenüber den Kontrollversuchen durch Prednisolonacetat eine Steigerung der Fermentaktivität erkennen (Tabelle 8).

In der Lymphopoese stieg die relative Zellzahl in den Kontrollpräparaten bis 24 Stunden an und blieb dann annähernd auf gleicher Höhe. In den Zusatzkulturen dagegen war ein kontinuierliches Ansteigen der Zellzahlen bis 72 Stunden zu beobachten. Diese Steigerung war statistisch signifikant (Abbildung 6, Tabelle 13, 14 und 15).

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Es wird hier an menschlichen Knochenmarkkulturen untersucht, welchen Einfluß ein zugesetztes Corticosteroid (Prednisolonacetat) auf Proliferation und Beladung der Zellen mit alkalischer Leukocytenphosphatase hat.

Die meisten Autoren verwandten unphysiologisch hohe und weit über dem therapeutisch gebräuchlichen Wert liegende Hormondosen. Wir hingegen wollten die Wirkung des Prednisolonacetats im therapeutischen Bereich untersuchen. Als Anhalt für die Versuchskonzentration dienten uns die Untersuchungsergebnisse von KRISCH[23], der mit der De Moore'schen Methode eine physiologische Cortisolkonzentration im menschlichen Serum von 0,10 - 0,20 µg/ml feststellte.

Hieraus und aus der Tatsache, daß eine tägliche Produktion von 20 - 30 mg Cortisol diesen Spiegel von 0,10 bis 0,20 µg/ml aufrecht erhält[21], läßt sich berechnen, daß die verwendete Konzentration von 0,25 µg/ml Prednisolonacetat im Kulturmedium einer therapeutischen Dosis von 30 - 50 mg Prednisolonacetat pro Tag entspricht:

Geht man davon aus, daß das Aktivitätsverhältnis zwischen Cortisol und Prednisolon - beurteilt nach der sog. antiinflammatorischen Wirkung bei Rheumapatienten[38] - 1 : 4 beträgt, so entsprechen 0,25 µg/ml Prednisolon 1 µg/ml Cortisol. Außerdem befinden sich im Kulturmedium Serum und Plasma des Knochenmarkspenders, die um 4/5 verdünnt wurden, so daß als Mittelwert für das physiologisch vorhandene Cortisol 0,15 µg/ml x 4/5 = 0,12 µg/ml Cortisol addiert werden müssen. Die Cortisol-Äquivalenzkonzentration beträgt im Kulturmedium also 1,12 µg/ml, d.h. sie liegt siebenmal so hoch wie der Normalspiegel. Um diese Konzentration zu erreichen, müßten

im Körper pro Tag 140 - 210 mg Cortisol produziert werden oder 30 - 50 mg Prednisolon zugeführt werden.

Diese Rechnung gibt überschlagsmäßig nur einen groben Anhalt, da sie voraussetzt, daß die Patienten, die das Knochenmark spendeten, einen normalen Cortisolspiegel haben und daß das Cortisol gleichmäßig im Körper verteilt ist. Außerdem muß vorausgesetzt werden, daß die Ausscheidung und Metabolisierung von Prednisolonacetat derjenigen von Cortisol entspricht.

Die in unseren Untersuchungen nachgewiesene, durch Prednisolonacetat hervorgerufene signifikante Proliferationshemmung in der Granulocytopoese und Erythropoese stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein (10, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 24, 27, 29, 32, 37, 39).

Nur bei einem Fall von sideroachrestischer Anaemie sieht man in der Erythropoese eine signifikante Reifungsbeschleunigung, die als eine "Normalisierung" der durch das Krankheitsbild hervorgerufenen Linksverschiebung in der roten Reihe zu bewerten ist.

Bei Knochenmarkuntersuchungen wurde von BOLL[5)] nach Zugabe von 2,5 mg/ml Prednisolon-Natriumtetrahydrophthalat eine Reifungsförderung in der menschlichen Granulocytopoese beobachtet, während in unseren Untersuchungen mit 0,25 µg/ml Prednisolonacetat in der Kultur eine Reifungshemmung auftrat. Es ist daher anzunehmen, daß mit hoher Corticosteroid-Konzentration die Mitoserate vermindert (NOWELL[29)]), aber die Zellausreifung gefördert (BOLL[8)]) wird, während mit einer den physiologischen Bereich nur wenig übersteigenden Konzentration eine Hemmung der Knochenmarkproliferation eintritt (unsere Ergebnisse). Mit der von uns verwendeten Konzentration wurde auch an Mäusefibroblasten eine Wachstumshemmung erreicht (TAIFOUR[37)]).

In unseren Kulturen hat sich der Anteil an Lymphoblasten

und Lymphocyten unter dem Einfluß von Prednisolonacetat bis zum 72-Stunden-Zeitpunkt stark vermehrt (Tabelle 13 und 14, Abbildung 6). Es muß angenommen werden, daß die Vermehrung der lymphatischen Zellen relativ und durch Hemmung der Proliferation der Erythropoese und der Granulocytopoese bedingt ist.

Die Abnahme der Retikulumzellen unter Prednisolon-Zusatz stimmt mit den Ergebnissen der Tierversuche von FLEISCHER[13] überein.

Da bisher nur bekannt ist, daß unter Corticosteroid-Einfluß eine Zunahme der Aktivität der alkalischen Leukocytenphosphatase im Blut und anderen Geweben eintritt (3, 7, 8, 9, 35, 36), bot sich an, entsprechende Untersuchungen an Knochenmark durchzuführen.

Nach den vergleichenden Untersuchungen an Blut- und Knochenmark-Ausstrichen von DÜRING[11] verhält sich die Aktivität der alkalischen Leukocytenphosphatase bei Blut- und Knochenmarkzellen in vivo etwa gleich. Bei Kultivierung von Knochenmarkzellen allerdings zeigte sich eine signifikante Steigerung der ALP-Aktivität in den einzelnen Zellen bis 48 Stunden. Unsere Untersuchungen führten zu ähnlichen Ergebnissen: In den Kulturen ohne Hormonzusatz steigt die ALP-Aktivität bis 48 Stunden an und sinkt dann wieder etwas ab (in 3 von 4 Fällen).

In den Kulturen mit Prednisolonacetat-Zusatz haben wir in allen 4 Fällen eine Steigerung der Fermentaktivität gesehen, die höher als die Steigerung in den Kontrollen liegt. Nur in einem Fall übersteigt der Kontrollwert den entsprechenden 72-Stunden-Wert im Zusatzpräparat. Wir erreichten mit unserer Prednisolonacetat-Konzentration also den gleichen Effekt an menschlichen Knochenmarkzellen, den andere Autoren mit höheren Konzentrationen von Corticosteroiden an verschiedenen Geweben sahen.

Über die Bedeutung des Anstieges der Phosphatase-Aktivität besteht wenig Klarheit. Die Tatsache, daß bakterielle Infekte zu einer Erhöhung der ALP-Aktivität führen (11), spricht für eine Verbindung einer gesteigerten Fermentaktivität mit einer Funktionssteigerung der Leukocyten. DÜRING sah bei Knochenmarkausstrichen, die bei 7° C aufbewahrt wurden, gleich hohe ALP-Aktivitäten wie bei 37° C. Möglicherweise ist die Höhe des ALP-Index ein Parameter für einen Degenerationsprozess der Granulocyten. Damit unterstützen die Ergebnisse der ALP-Färbung die der Differentialzählung, die auf eine Reifungshemmung der Granulocyten hinweisen. Hierfür würden Beobachtungen von LÖFFLER[25] sprechen, der in Punktaten aus Ergüssen eine starke Aktivität der alkalischen Leukocytenphosphatase in den leukocytären Abbauformen fand. Der Aktivitätsabfall nach 48 Stunden Kulturzeit müßte dann jedoch auf eine andere Ursache zurückgeführt werden.

Wenn man versucht, unsere Ergebnisse auf die Klinik zu übertragen, läßt sich feststellen, daß die Corticosteroid-Therapie bei Leukopenien, die durch eine toxische Knochenmarkschädigung hervorgerufen sind, kontraindiziert ist. Dies betrifft allerdings nicht die Behandlung antikörperbedingter Pancytopenien, die ihre Ursache ja nicht in einer Knochenmarkdepression haben. Hier bleiben die Corticosteroide auch weiterhin das Mittel der Wahl, weil sie die Antikörperbildung hemmen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Es wurde nachgewiesen, daß durch den Zusatz von 0,25 µg/ml Prednisolonacetat zum Kulturmedium eine Hemmung der Proliferation der Erythropoese - weniger der Granulocytopoese - in vitro erreicht wird. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant. Nur bei einem Fall von sideroachrestischer Anaemie trat eine Reifungsförderung der Erythropoese in vitro auf.

Die retikulären Zellen wurden signifikant vermindert, während es unter Prednisolonacetat zu einer relativen Vermehrung der lymphatischen Zellen kam.

Außerdem bewirkte Prednisolonacetat eine Erhöhung der Aktivität der alkalischen Leukocytenphosphatase in den Granulocyten und den Retikulumzellen.

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie EURATOM-GSF, Nr. 031-64-1 BIAD.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ADDISON, Th.: On the disease of supraadrenal capsules. London med. Gaz. 43 (1855)
2. BELITZ, H.-J.: Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Sonderdruck aus "Der Mathematikunterricht", Heft 3/60 (Klett, Stuttgart)
3. BISHOP, C.R., J.W. ATHENS: Studies of granulocytopoiesis in abnormal conditions. in: F. STOHLMAN jr.: Haemopoietic Cellular Proliferation (1970)
4. BOLL, I.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. (Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1966)
5. BOLL, I., G. MERSCH, S. SCHOEN, U. GÖTTKE, D. BOXHEIMER, G. LUCKE: Hormoneinwirkung auf die Proliferationskinetik humaner Knochenmarkkulturen. Klin. Wschr. 46: 608 (1968)
6. CAVALLI-SFORZA, L.: Biometrie. (Fischer, Stuttgart 1969)
7. COX, R.P., C.M. McLEOD: Hormonal induction of alkaline phosphatase in human cells in tissue cultures. Nature 190: 85 (1961)
8. COX, R.P., C.M. McLEOD: Alkaline phosphatase content and the effect of Prednisolone on mammalian cells in culture. J. gen. Physiol. 45: 439 (1962)
9. CREAM, J.J., L.J. LABS: Prednisolone-induced granulocytosis. Brit. J. Haemat. 15: 259 (1968)

10. DARZYNKIEWICZ, Z., M. PIENKOWSKI: Effect of Prednisolone on RNA-synthesis in human lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin.
Exp. Cell Res. 54: 289 (1969)

11. DÜRING, G.: Die zytochemische Reaktion der alkalischen Leukocytenphosphatase in der Knochenmarkkultur.
Diss. (Berlin 1969)

12. FARNES, P., B.E. BARKER: Effect of Prednisolone on human bone marrow cultures.
Metabolism 14: 1 (1965)

13. FLEISCHER, J.: Die Wirkung längerer Gaben von Prednisolon und Endoxan auf das Knochenmark des Kaninchens.
Folia haemat., N.F., 7: 323 (1963)

14. GABOUREL, L., I. ARONOW: zitiert nach: U. HECKMANN: Zur Prednisolonwirkung auf Malignomzellen in der Gewebekultur.
Med. Welt, N.F., 18: 483 (1967)

15. GROSSER, B.I., H.E. SWIM: zitiert nach: U. HECKMANN: Zur Prednisolonwirkung auf Malignomzellen in der Gewebekultur.
Med. Welt, N.F., 18: 483 (1967)

16. HECKMANN, U.: Zur Prednisolonwirkung auf Malignomzellen in der Gewebekultur.
Med. Welt, N.F., 18: 483 (1967)

17. HEILMANN, D.H.: Combined action of adrenal cortical hormones and endotoxin on cells of the RES.
Int. Arch. Allergy 35: 591 (1969)

18. HENCH, P.S., E.C. KENDALL, C.H. SLOCUMB, H.F. POLLY: The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis.
Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. 24: 181 (1949)

19. HUNSTEIN, W., M. STREY: Zur Wirkung von Prednisolon auf die H^3-Thymidin-Einbaurate in Knochenmarkzellen von Ratten.
Klin. Wschr. 43: 52 (1965)

20. JAFFE, J.J., G.A. FISCHER, A.D. WELCH: zitiert nach: U. HECKMANN: Zur Prednisolonwirkung auf Malignomzellen in der Gewebekultur.
Med. Welt, N.F., 18: 483 (1967)

21. KAISER, H.: Cortisonderivate in Klinik und Praxis. (Thieme, Stuttgart 1965) 4. Aufl.

22. KAPLOW, L.S.: A histochemical procedure for localizing and evuluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow.
Blood 10: 1023 (1955)

23. KRISCH, K.: Physiologisch-chemische Grundlagen der Wirkung von Corticosteroiden.
Therapiewoche 50: 18 (1968)

24. KUMMER, D., H.-D. OCHS: Cytostatische Wirkungen von Cortisol und verwandten Steroiden an Krebszellen.
Z. Physiol. Chem. 349: 9 (1968)

25. LÖFFLER, H.: Diskussionsbeitrag zum Thema Grundlagen zur klinisch-morphologischen Blutdiagnostik mit Hydrolasen. Cyto- und Histochemie in der Haematologie. IX. Freiburger Symposion.
(Springer 1963)

26. MACIEIRA, C.A.: Action of cortisone on human fibroblasts in vitro.
Experientia 22: 390 (1961)

27. MEISSNER, J., H.G. HANSEN, U. WULFF: Zum Wirkungsmechanismus des Cortisons auf den Nukleinsäurestoffwechsel.
2. Jahrestagg. Ges. f. Nukl. Med., Heidelberg 1964, S. 1377

28. MERKER, H., L. HEILMEYER: Die alkalische Phosphatase neutrophiler Leukocyten.
Dtsch. med. Wschr. 85: 253 (1960)

29. NOWELL, P.C.: Inhibition of human leukocyte mitosis by prednisolone in vitro.
Cancer Res. 21: 1518 (1961)

30. QUITTNER, H., N. WALD, L. SUSSMAN, W. AUTOPOL: The effect of massiv doses of cortisone on the peripheral blood and bone marrow of the mouse.
Blood 6: 513 (1951)

31. RASCHE, B., W.T. ULMER: Glucocorticoideinwirkung auf Wachstum und Stoffwechsel permanenter Fibroblastenkulturen in Abhängigkeit von Konzentration und Expositionsdauer.
Z. Zellforsch. 84: 506 (1968)

32. REISNER, E.H. jr., R. ODOM: Effects of different hormones on blood cells differentiation in bone marrow in vitro.
Excerpta med. 16: 812 (1962)

33. ROZEN, V.B., L.S. CHERMIN: The effect of various glucocorticoid doses on the growth of single-layer connective tissue cultures.
Patol. Fiziol. Eksp. Terapiya 8: 59 (1964)

34. SPANNHOFF, L.: Einführung in die Praxis der Histochemie.
(Fischer, Jena 1964)

35. STRAUSZ, I., E. KEKES, A. SZEBENI: Mechanism of prednisolon-induced leukocytosis in man.
Acta haemat. 33: 40 (1965)

36. SZATMÁR, E., D. LEHOCZKY, T. FEHER: Neutrophil granulocyte alkaline phosphatase activity after intravenous injection of synthetic ACTH.
13. Int. Haemat. Kongr., München 1970, S. 41

37. TAIFOUR, A.-H.: Autoradiographische Untersuchungen an Glucocorticoid-vorbehandelten Mäusefibroblasten-Kulturen.
Diss. (Mannheim 1968)

38. TAUSK, M.: Pharmakologie der Hormone.
(Thieme, Stuttgart 1970)

39. THOMAS, K., E. SEIDLER: Knochenmark in vitro unter dem Einfluß cytostatischer und hormoneller Substanzen.
Folia haemat., N.F., 4: 2 (1960)

40. UNDRICOV, M.I., V.B. ROZEN, L.S. CHERMIN: Rolle der Glucocorticoid-Hormone in der Pathogenese des experimentellen Rheumatismus.
Vopr. revmat., Moskva, 4: 7 (1964)

Frau Professor Dr. med. Irene Boll
möchte ich für die freundliche Unterstützung dieser
Arbeit aufrichtig danken.

LEBENSLAUF

Am 30. 6. 1943 wurde ich, Ulrich Christoph, als Sohn des Zahnarztes Georg Christoph und seiner Ehefrau Käthe, geb. Schulz, in Berlin-Zehlendorf geboren.

Im Jahre 1949 wurde ich in Berlin eingeschult und legte hier 1963 die Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Zahnmedizin. Am 28. 2. 1969 bestand ich hier die zahnärztliche Prüfung.

Seit April 1969 arbeite ich als Assistent bei einem Zahnarzt in der freien Praxis.

Druck:
Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -
1 Berlin 41, Kelchstraße 31